

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS
Y BIOTECNOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
BIOTECNOLÓGICA



**“ADAPTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE FERTILIZACIÓN *in vitro*
PARA ALPACAS (*Vicugna pacos*) Y SU EVALUACIÓN A 4200 MSNM
EN EL DEPARTAMENTO DE PUNO.”**

Tesis presentada por el Bachiller:

Málaga Chuquitaype, Rajiv Erón

Para optar el Título Profesional de

Ingeniero Biotecnólogo

Asesora:

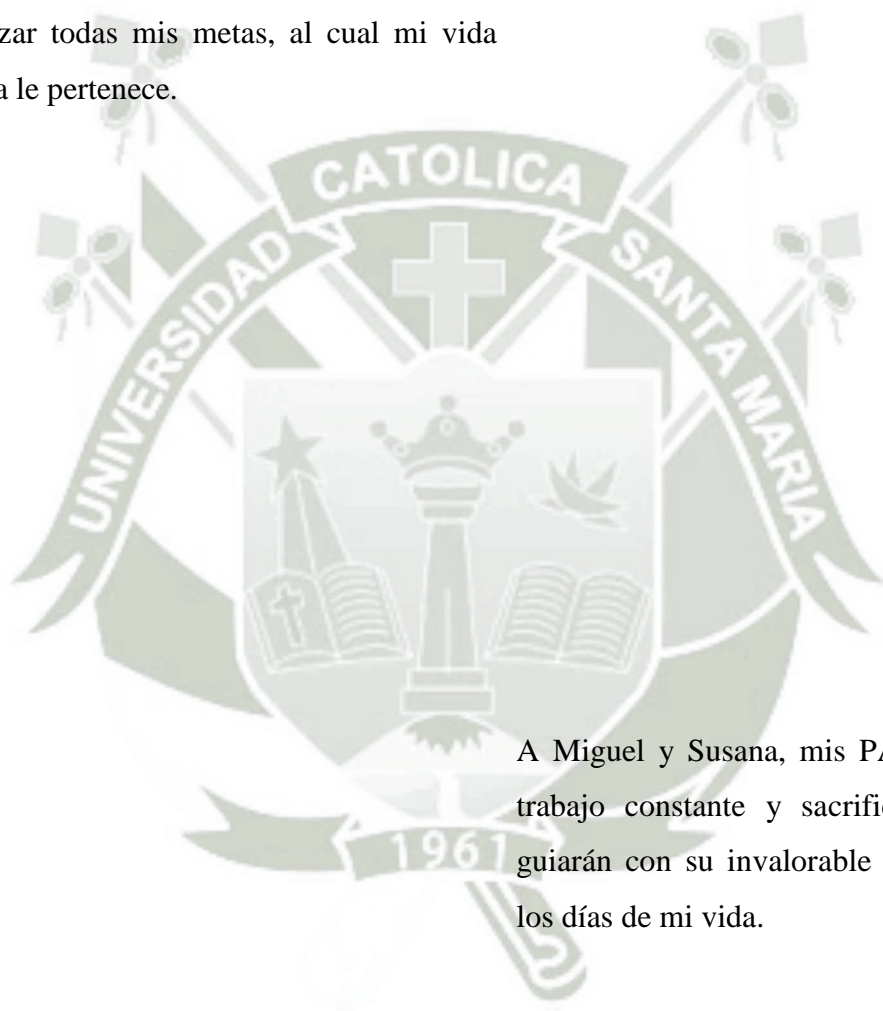
Dra. Milagro Terán Dianderas

Co- asesor:

Dr. Teodosio Huanca Mamani

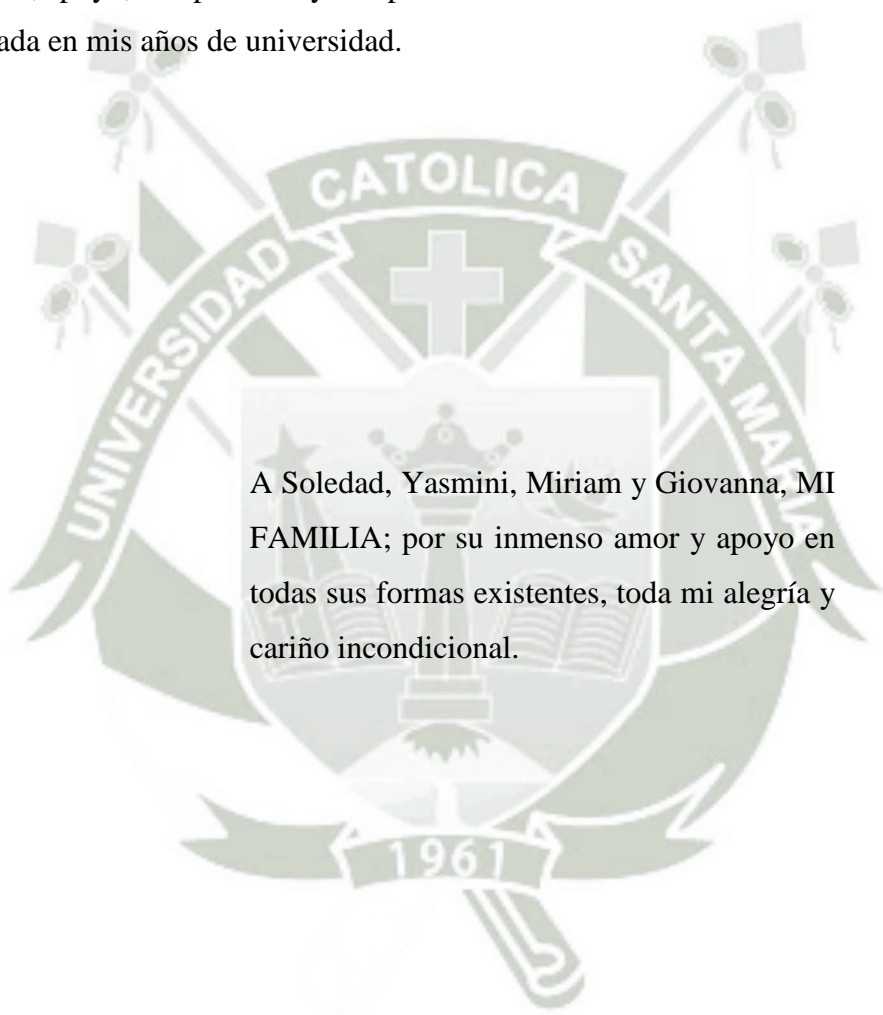
AREQUIPA - PERU
2015

A Dios, quien me dio la vida y la fuerza para
alcanzar todas mis metas, al cual mi vida
entera le pertenece.



A Miguel y Susana, mis PADRES cuyo
trabajo constante y sacrificio abnegado,
guiarán con su invaluable ejemplo todos
los días de mi vida.

A Christian, José María, Miguel Ángelo
y Andreé, mis HERMANOS, por su
ejemplo, apoyo, comprensión y compañía
brindada en mis años de universidad.



A Soledad, Yasmini, Miriam y Giovanna, MI
FAMILIA; por su inmenso amor y apoyo en
todas sus formas existentes, toda mi alegría y
cariño incondicional.

A Joaquín y María Gracia, mis SOBRINOS,
quienes mantienen viva en mí la esperanza en
la lucha por un futuro mejor.

A LA MEMORIA:

De mi abuelito Neptalí, hombre de gran desprendimiento e intachable calidad humana, cuyos principios y trabajo incansable guiarán mi vida profesional.

De Oscar Julio Albarracín Salgado, al amigo, profesor y ejemplo de padre, quien despertó en mi la vocación por esta visionaria carrera en pro del desarrollo y preservación de la fauna nacional.



Al ALPAQUERO PERUANO, férreo y sacrificado guardián ancestral, a quien debemos la preservación milenaria de los camélidos sudamericanos en el mundo.

MI AGRADECIMIENTO:

- Al CONCYTEC, por el apoyo brindado a la EEA Illpa Puno, especialmente al Programa de Investigación en Camélidos para el financiamiento de la presente tesis.
- A la Dra. Milagro Terán Dianderas, por su amistad, apoyo y acertadas correcciones en la orientación del presente trabajo.
- Al Dr. Teodosio Huanca Mamami, jefe del Programa Nacional de Investigación en Camélidos (PNIC) del INIA, por su confianza, orientación y la oportunidad brindada para poder ejecutar el presente trabajo.
- A la Blga. Lariza Pahuara Farfán y MVZ Yanin Murillo, por su gran amistad, por los grandes momentos compartidos y las enseñanzas brindadas de manera desprendida durante el desarrollo de la presente tesis.
- A los MVZ Oscar Cárdenas, Rómulo Sapana y Mario Lino Gonzales, por su amistad, las enseñanzas y las facilidades brindadas.
- A Leónidas Hanco Cardeña, por su vital y constante apoyo en la ejecución del presente trabajo.
- Al personal del CIP Quimsachata, quienes con su compañía alivianaron la carga de la soledad y brindaron calidez a mis días en la estación.
- A Cecilia Quispe Alanguía, y a mis grandes amigos de la UNMSM por su apoyo y conocimientos compartidos en pro de la investigación y desarrollo de los camélidos.
- A la Universidad Católica de Santa María de Arequipa, mi alma mater; por la formación ética profesional en mi educación universitaria.
- A mis compañeros de la 9° promoción de Ingeniería Biotecnológica, por los alientos, amistad e invaluable compañía brindada.
- Con inmenso cariño e incalculable agradecimiento a mis compañeros; Diego y Daniel Albarracín, y a “Los Chochz” de la promoción 2008 del Colegio Internacional Peruano Británico, mis hermanos y compañeros de hazañas por los grandes recuerdos y aliento en todo momento, pues jamás me hacen sentir solo.
- A todas aquellas personas que de una u otra forma apoyaron en el desarrollo de esta tesis y permitieron alcanzar un objetivo más en mi vida; SER PROFESIONAL.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVIII
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
CAPITULO II.....	5
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. LA ALPACA.....	5
2.1.1. Generalidades.....	5
2.1.2. Importancia Nacional.....	5
2.2. ANATOMÍA REPRODUCTIVA DE LA ALPACA.....	6
2.2.1. Anatomía reproductiva de la alpaca hembra.....	6
2.2.2. Anatomía reproductiva de la alpaca macho.....	6
2.3. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA ALPACA.....	7
2.3.1. Fisiología reproductiva de la alpaca hembra.....	7
2.3.2. Fisiología reproductiva de la alpaca macho.....	12
2.4. MADURACIÓN IN VITRO.....	14
2.4.1. Recolección y transporte de ovarios.....	14
2.4.2. Recuperación de los ovocitos.....	15
2.4.3. Selección de ovocitos.....	16
2.4.4. Medios de maduración <i>in vitro</i>	17
2.4.5. Condiciones para la maduración <i>in vitro</i>	17
2.4.6. Suplementación del medio de maduración.....	19
2.5. FECUNDACIÓN IN VITRO.....	20
2.5.1. Colección de semen.....	20
2.5.2. Métodos de selección espermática.....	20
2.5.3. Agentes de la capacitación espermática <i>in vitro</i>	21
2.5.4. Medios de fertilización <i>in vitro</i>	22

2.6. CULTIVO DE EMBRIONES IN VITRO	22
2.6.1. Selección de embriones viables	22
2.6.2. Medios de cultivo embrionario <i>in vitro</i>	23
2.6.3. Condiciones y sistema de cultivo embrionario <i>in vitro</i>	23
2.6.4. Criterios de clasificación y evaluación embrionaria	24
2.6.5. Desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	25
2.7. BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS AFINES	25
2.7.1. Transferencia de embriones	25
2.7.2. Vitricación de embriones.....	26
CAPITULO III.....	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	27
3.1.1. Ubicación	27
3.1.2. Condiciones ambientales.....	27
3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL	27
3.2.1. Fuente de recolección de ovarios	27
3.2.2. Fuente de obtención de semen	28
3.3. MATERIALES.....	28
3.3.1. Material biológico.....	28
3.3.2. Material de vidrio.....	28
3.3.3. Material de plástico.....	28
3.3.4. Reactivos.....	29
3.3.5. Equipos	30
3.4. METODOLOGÍA.....	30
3.4.1. Recolección y transporte de los ovarios.....	30
3.4.2. Limpieza y selección de los ovarios de trabajo.....	31
3.4.3. Recuperación de los ovocitos.....	31
3.4.4. Clasificación de los ovocitos.....	33
3.4.5. Maduración <i>in vitro</i>	34
3.4.6. Evaluación del tiempo de maduración <i>in vitro</i>	34
3.4.7. Suplementación nutricional de las alpacas machos.....	35
3.4.8. Colección de semen	35
3.4.9. Selección del método de colección de semen	36
3.4.10. Estandarización de la técnica de gradiente de densidad.....	36
3.4.11. Lavado de los espermatozoides.....	37
3.4.12. Capacitación espermática.....	37
3.4.13. Fertilización <i>in vitro</i>	37
3.4.14. Evaluación de la concentración espermática en la fertilización.....	38
3.4.15. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones.....	38
3.6. ANÁLISIS DE RESULTADOS	39

CAPITULO IV	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1. RESULTADOS EXPERIMENTALES	41
4.1.1. Recolección y transporte de los ovarios.....	41
4.1.2. Evaluación de la tasa de recuperación por slicing y aspiración folicular.....	42
4.1.3. Evaluación de la recuperación de ovocitos en ovarios con CL y ovarios sin CL	43
4.1.4. Maduración <i>in vitro</i>	44
4.1.5. Colección de semen	46
4.1.6. Estandarización de la técnica de gradiente de densidad.....	48
4.1.7. Fertilización <i>in vitro</i>	51
4.2. EVALUACIÓN GENERAL DEL PROTOCOLO DE FIV A 4200 MSNM	53
CONCLUSIONES.....	65
RECOMENDACIONES.....	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXOS.....	76
ANEXO 1. ANATOMÍA DE LA ALPACA.....	76
ANEXO 2. FISIOLÓGÍA DE LA ALPACA	77
ANEXO 3. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE MATERIALES Y MÉTODOS	79
ANEXO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	82
ANEXO 5. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE RESULTADOS DE LA ADAPTACIÓN Y EVALUACIÓN DEL PROTOCOLO A 4200 MSNM.....	83
ANEXO 6. REGISTRO FOTOGRÁFICO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO OBTENIDO	84
ANEXO 7. FICHAS DE LOS MACHOS DE COLECCIÓN DE SEMEN CIP QUIMSACHATA (AGOSTO - NOVIEMBRE 2014).....	87
ANEXO 8. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE MEDIOS.....	90
ANEXO 9. FICHAS DE REGISTRO DEL INGRESO DE MUESTRAS Y CORRIDAS	95
ANEXO 10. PROTOCOLO DE FERTILIZACIÓN IN VITRO EN ALPACAS.....	151

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Criterios de selección de COCs y ovocitos según Hawk y Wall (1994) ¹⁶	17
Tabla N° 2. Parámetros de la primera clasificación.....	33
Tabla N° 3. Parámetros de la segunda clasificación	34
Tabla N° 4. Parámetros de selección de ovocitos maduros	38
Tabla N° 5. Temperatura y tiempo de transporte de las muestras.	41
Tabla N° 6. Promedio de recuperación de ovocitos por Slicing y Aspiración.....	42
Tabla N° 7. Calidad de ovocitos recuperados por Slicing y Aspiración.....	42
Tabla N° 8. Tasa de recuperación en ovarios con CL y sin CL.....	43
Tabla N° 9. Calidad de ovocitos recuperados de ovarios con CL y sin CL.....	44
Tabla N° 10. Evaluación de tiempos para MIV de ovocitos de alpaca.....	45
Tabla N° 11. Características del semen colectado por VA	46
Tabla N° 12. Características del semen colectado por EE.....	46
Tabla N° 13. Colecciones de semen realizadas por VA	47
Tabla N° 14. Evaluación de la gradiente de densidad.....	49
Tabla N° 15. Evaluación de las RPM	49
Tabla N° 16. Evaluación del tiempo de centrifugación	50
Tabla N° 17. Concentración espermática y porcentaje de fertilización	51
Tabla N° 18. Tasa de recuperación de ovocitos.....	53
Tabla N° 19. Tasa de maduración <i>in vitro</i>	55
Tabla N° 20. Desarrollo embrionario total del protocolo	63
Tabla N° 21. Composición del medio de transporte	90
Tabla N° 22. Composición del medio de lavado	90
Tabla N° 23. Composición del medio de maduración	91
Tabla N° 24. Composición del medio SPERM - TALP	92
Tabla N° 25. Composición del medio FERTIL-TALP.....	92
Tabla N° 26. Composición del medio KSOMaa.....	93
Tabla N° 27. Composición del medio SOFaa.....	93
Tabla N° 28. Composición del dilutor Tris – Yema de huevo.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Ciclos foliculares de la alpaca. ⁹	9
Figura N° 2. Ovocitos recuperados de categoría I y II respectivamente.....	44
Figura N° 3. Concentración y tasa de fertilización	52
Figura N° 4. Tasa de recuperación de ovocitos.	54
Figura N° 5. Porcentaje de ovocitos recuperados por categoría	54
Figura N° 6. Porcentaje de maduración <i>in vitro</i> por cada corrida.....	56
Figura N° 7. Ovocitos madurados <i>in vitro</i>	56
Figura N° 8. Porcentaje de fertilización <i>in vitro</i> por corrida.....	57
Figura N° 9. Porcentaje de desarrollo embrionario al 7° día.	59
Figura N° 10. Desarrollo embrionario de mórulas y blastocistos al 7° día.....	60
Figura N° 11. Desarrollo embrionario de mórulas por corrida al 7° día.....	61
Figura N° 12. Mórula compacta, evaluada al día 7.....	61
Figura N° 13. Desarrollo embrionario de blastocistos por corrida al 7° día.	62
Figura N° 14. Blastocisto eclosionado evaluado a los 7 días.....	62
Figura N° 15. Gráfico de desarrollo embrionario total de embriones obtenidos en el protocolo. 63	
Figura N° 16. Aparato reproductor de la alpaca. ⁵⁵	76
Figura N° 17. Aparato reproductor del camélido macho. ⁵⁵	76
Figura N° 18. Ovogénesis en mamíferos. Adaptado a partir de Hafez ⁹	77
Figura N° 19. Dinámica folicular de la alpaca. ⁹	77
Figura N° 20. Los distintos pasos de la espermatogénesis en el toro. ⁹	78
Figura N° 21. Epitelio seminífero que muestra la naturaleza compleja de la asociación entre células de Sertoli y las células germinales en desarrollo. ⁹	78
Figura N° 22. Etapas del desarrollo temprano en el embrión bovino. ⁹	79
Figura N° 23. Centros de recolección de ovarios. (A) Camal Municipal de Nuñoa. (B) Centro de beneficio familiar	79
Figura N° 24. Lavado, selección y clasificación de los ovarios recolectados de matadero.	80
Figura N° 25. Recuperación de ovocitos mediante la técnica de slicing modificado.	80
Figura N° 26. Ovocitos recuperados por slicing de ovarios de matadero.	80
Figura N° 27. Suplementación vitamínica vía intramuscular a los machos de colección.....	81
Figura N° 28. Colección de semen con VA en maniquí (der.) Vagina artificial (izq.)	81
Figura N° 29. Ovocitos detenidos en su desarrollo por polispermia.....	81
Figura N° 30. Ovocitos recuperados por slicing en sus diferentes categorías	82
Figura N° 31. Expansión de las CCs que indican la maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos.	82
Figura N° 32. Formación del pellet en la base del tubo como producto de la estandarización de la gradiente de Percoll ®.....	82
Figura N° 33. Clasificación de los ovocitos recuperados en tres categorías I, II y III	83

Figura N° 34. Cuerpo polar (CL) en el espacio previtelino del ovocito maduro.	83
Figura N° 35. Desarrollo de embriones en diferentes estadios producto de la FIV.	83
Figura N° 36. Desarrollo embrionario a las 24 horas	84
Figura N° 37. Desarrollo embrionario a las 48 horas	84
Figura N° 38. Desarrollo embrionario al 6 día.....	85
Figura N° 39. Desarrollo embrionario al 7 día.....	85
Figura N° 40. Blastocistos eclosionados al 6 día	86



ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

BSA: Bovine Serum Albumin; Albumina Sérica Bovina (ASB)

BSA FAF: Bovine Serum Albumin Free Acid Fat; ASB Libre de Ácidos Grasos

CIV: Cultivo *in vitro*

CIP: Centro de Innovación y Producción

COC: Complejo Ovocito – Cúmulus

CCs: Células del Cúmulus

CL: Cuerpo Lúteo

CSA: Camélidos Sudamericanos

EAA: Essential Amino Acids, Aminoácidos Esenciales

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracético

EE: Electroeyaculación

EGF: Epidermal Growth Factor, Factor de Crecimiento Epidérmico (FCE)

ECG: Equine Chorionic Gonadotropin, Gonadotropina Coriónica Equina

Esp/ml: Espermatozoides por mililitro

FCS: Fetal Cow Serum, Suero Fetal Bovino (SFB)

FF: Fluido Folicular

FGF: Fibroblastic Growth Factor, Factor de Crecimiento Fibroblástico (FCF)

FIV: Fertilización *in vitro*

FSH: Follicular Stimulant Hormone, Hormona Folículo Estimulante

HcG: Human Chorionic Gonadotropin, Gonadotropina Coriónica Humana

HEPES: N-(2-hidroxietil) piperazina – N'-2 – ácido etanolsulfónico

IETS: International Embryo Transfer Society

KSOMaa: Medio Optimizado Simple de Potasio

LH: Hormona Luteinizante

MI: Metafase I

MII: Metafase II

MIV: Maduración *in vitro*

NEAA: Non Essential Amino Acids, Aminoácidos No Esenciales

OPU: Ovum Pick-Up

PBS: Phosphate Buffered Saline, Buffer Fosfato Salino

PHE: Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina

PIVE: Producción *in vitro* de Embriones

RPM: Revoluciones por minuto

SOF: Synthetic Oviductal Fluid, Fluido Oviductal Sintético

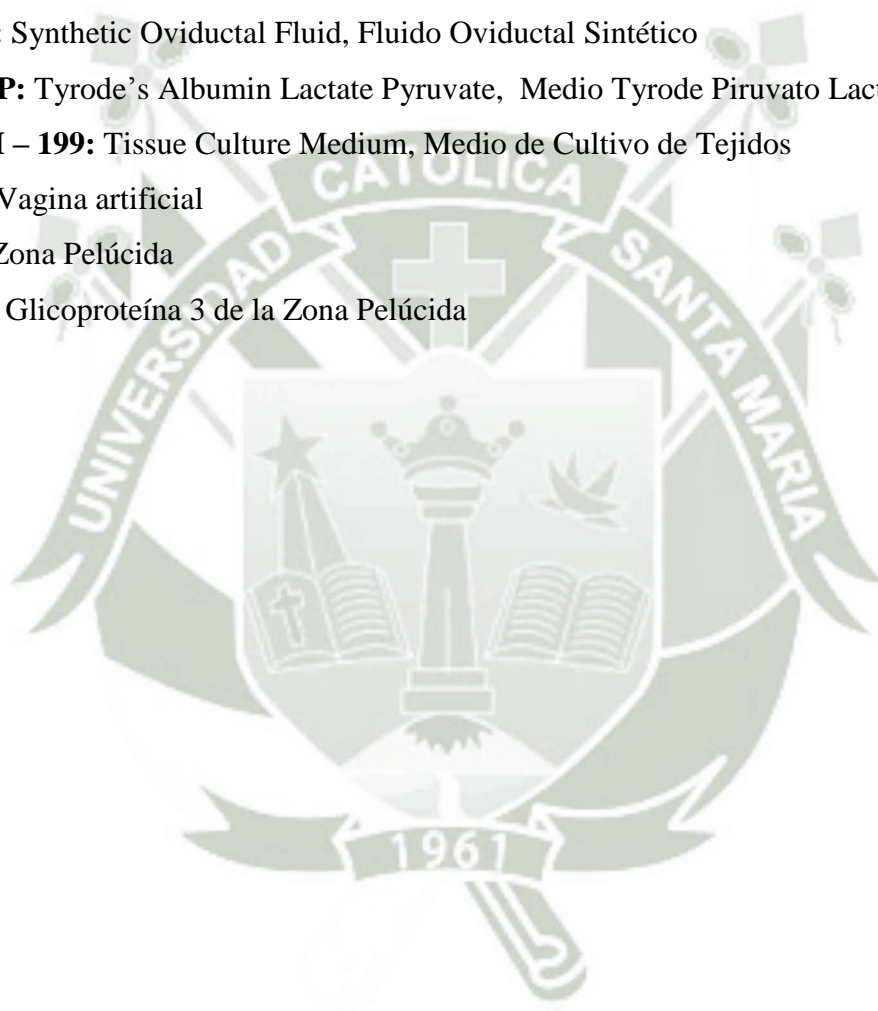
TALP: Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate, Medio Tyrode Piruvato Lactato Albumina

TCM – 199: Tissue Culture Medium, Medio de Cultivo de Tejidos

VA: Vagina artificial

ZP: Zona Pelúcida

ZP3: Glicoproteína 3 de la Zona Pelúcida



RESUMEN

En los últimos años se ha venido incrementando el interés en la producción y reproducción de camélidos sudamericanos (CSA), para lo cual se vienen desarrollando proyectos que buscan la mejora genética principalmente de las alpacas (*Vicugna pacos*). Las biotecnologías reproductivas son una alternativa de gran valor tecnológico para disminuir el intervalo generacional de la mejora genética, sin embargo, actualmente es escasa la información sobre protocolos relacionados a la fertilización *in vitro* en alpacas y nula con resultados positivos en su desarrollo y aplicación en las condiciones altoandinas propias del hábitat de estos animales.

El presente trabajo usó como base el protocolo de producción *in vitro* de embriones bovinos (*Bos taurus*) del Dr. García Herradón de la Universidad de Santiago de Compostela – España. El objetivo del presente trabajo es adaptar el protocolo anteriormente mencionado para la producción *in vitro* de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*), desarrollarlo completamente bajo las condiciones propias de la zona y evaluar el desarrollo embrionario para disponer finalmente de un protocolo capaz de ser trabajado a condiciones de altura a 4200 msnm.

Los ovarios fueron recolectados en centros de beneficio y transportados hasta los laboratorios del CIP Quimsachata para su procesamiento. Se evaluó la tasa de recuperación de ovocitos por slicing y por aspiración folicular para establecer la técnica que se usaría a lo largo del protocolo. También se evaluó la tasa de recuperación de ovocitos en ovarios con cuerpo lúteo (CL) y sin CL para determinar a qué grupo priorizar en la recuperación.

De todos los ovocitos recuperados y categorizados en I, II y III; solamente se trabajó con aquellos que presentaron las mejores condiciones, es decir, las categorías I y II. El tiempo de maduración *in vitro* para el presente trabajo en alpacas, fue determinado mediante evaluaciones morfológicas a las 24, 32 y 34 horas, bajo las cantidades hormonales que establece el protocolo base y cultivado a 38.5 °C, con 5% de CO₂, 95% de aire y alta humedad.

Por otro lado se realizó colecciones de semen por electroeyaculación (EE) y vagina artificial (VA) para determinar la técnica más conveniente para obtener espermatozoides. Para la selección espermática, se estandarizó la técnica de gradiente de densidad empleando Percoll®, cuyas variables a estandarizar fueron; tipo de gradiente, tiempo de centrifugación y revoluciones por minuto (RPM). El semen colectado fue trabajado empleando el dilutor Tris – Citrato – Yema de huevo en la proporción 1:1 para la conservación y protección de los espermatozoides. Se evaluó el efecto de la fertilización con concentraciones espermáticas menores y mayores a 1×10^6 espermatozoides/ml en la tasa de fertilización *in vitro* cultivándose por 18 horas. El cultivo *in vitro* se llevó a cabo en medio optimizado simple de potasio (KSOMaa) y fluido oviductal sintético (SOFaa) a 38.5°C con 5% de CO₂ y 95% de aire por 7 días.

Finalmente el protocolo adaptado se desarrolló bajo las condiciones ambientales propias de la zona, bajo los parámetros y condiciones previamente establecidas para evaluar el desarrollo embrionario alcanzado, el cual presentó un 25% de división de 2 blastómeros, 30.95% de 4 blastómeros; 34.52 % de mórulas, 7.14% de blastocistos y 2.38% de

blastocistos eclosionados al 7° día, de un total de 84 cigotos cultivados. Al ser este el primer trabajo realizado en su totalidad a 4200 msnm en el CIP Quimsachata, y tomando en cuenta la influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos en la producción de embriones *in vitro*, los resultados son muy alentadores para la implementación de esta biotecnología reproductiva en camélidos.

Palabras Clave: MIV, FIV, CIV, desarrollo embrionario



ABSTRACT

In recent years there has been increasing interest in the production and reproduction of South American Camelids (CSA) for which they are developing projects that seek mainly breeding alpacas (*Vicugna pacos*). Reproductive biotechnologies are an alternative of great technological value to decrease the generation interval of genetic improvement, however, currently is scarce information above protocols related to *in vitro* fertilization in alpacas and void with positive results in its development and application in the own high Andean habitat conditions of these animals.

This work used with base the protocol of *in vitro* production of bovine embryos (*Bos taurus*) of Dr. García Herradón of the University of Santiago de Compostela – Spain. The objective of this work is to adapt the protocol above mentioned for the *in vitro* production of alpaca (*Vicugna pacos*) embryos, development entirely under the prevailing environmental conditions of the area and assess the embryonic development for finally have of one protocol capable of being worked at terms of height at 4200 meters of sea level.

The ovaries was recollected in profit centers and transported to the CIP Quimsachata laboratories for processing. The recovery rate of oocyte by slicing and aspiration was evaluated for establish the technique would be used throughout the protocol. The recovery rate of oocytes in ovaries with and without corpus luteum (CL) was also evaluated for determine which group prioritize recovering.

Of all oocytes retrieved and categorized in I, II and III; only it worked with those presented the best conditions, the category I and II. The time of *in vitro* maturation for this work, was determined with morphological evaluations at 24, 32 and 34 hours, under the same

hormonal conditions of the base protocol and cultivate at 38.5°C with 5% CO₂, 95% air and high humidity.

On the other hand was performed semen collection by electro ejaculation (EE) and artificial vagina (AV) to determine the technique more convenient to obtain sperm. For the sperm selection, the density gradient technique using Percoll® was standardized for; gradient type, centrifugation time and revolutions per minute (RPM). The collected semen was worked using the dilutor Tris - Citrate - Egg yolk in the ratio 1: 1 for the conservation and protection of sperm. The effect of lower fertilization and sperm concentrations greater than 1 x 10⁶ sperm / ml *in vitro* fertilization rate cultivated for 18 hours was evaluated. The culture *in vitro* was performed in single optimized through potassium (KSOMaa) and synthetic oviductal fluid (SOFF) at 38.5 ° C with 5% CO₂ and 95% air for 7 days.

Finally the adapted protocol was developed under the prevailing environmental conditions of the area under the conditions previously established parameters and to evaluate embryonic development reached, which provided 25% of division of 2 blastomeres, 30.95% of 4 blastomeres; 34.52% of morula, 7.14% of blastocysts and 2.38% of blastocysts hatched at day 7, a total of 84 zygotes culture. Being the first job made entirely at 4200 meters above sea level in the CIP Quimsachata, and taking into account the influence of the intrinsic and extrinsic factors in the *in vitro* embryos production, these results are more encouraging for the implementation of reproductive biotechnologies in camelids.

Key words: IVM, IVF, IVC, Embryo Development

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La alpaca (*Vicugna pacos*) es uno de los cuatro camélidos sudamericanos que se encuentra en nuestro país y es el camélido doméstico de mayor importancia productiva. La importancia de la alpaca radica principalmente en su fibra considerada la segunda más fina de los camélidos solamente después de la vicuña. También su carne es reconocida por la importancia nutricional que posee.¹

La alpaca posee características fisiológicas únicas, las cuales también se ven remarcadas en el aspecto reproductivo complejo que tienen.² La gestación en las hembras dura aproximadamente 341 a 345 días y son de ovulación inducida, lo cual la limita a tener una cría por año en las mejores condiciones. Este aspecto es desventajoso para el aprovechamiento de hembras de buena calidad genética en cuanto a fibra.³

La fisiología reproductiva de los machos está marcada por la aparente estacionalidad reproductiva, que se manifiesta en época de lluvia en las zonas altoandinas. Esto incrementa el libido en los machos pudiendo ser empleados hasta tres veces para el empadre en un solo día. Este inadecuado manejo genera la disminución de la calidad seminal del macho, así como la disminución de su libido. Son estos aspectos los que motivaron la investigación en tecnologías de reproducción asistida.³

Si bien los caminos proporcionados por las biotecnologías reproductivas son variados, todos estos apuntan a incrementar el número de crías en un menor tiempo con el aprovechamiento de los mejores reproductores para obtener crías con las mejores características posibles. Algunas biotecnologías como la inseminación artificial, la criopreservación de gametos, súper ovulación, producción de embriones *in vivo*, así como producción de embriones *in vitro* ha alcanzado resultados más que prometedores en

especies de interés ganadero como en bovinos u ovinos. Sin embargo en camélidos los estudios han sido limitados y restringidos por diversos factores.⁴

La aplicación de las biotecnologías reproductivas en camélidos, se ha desarrollado principalmente en llamas y alpacas. Si bien su aplicación aún es limitada y se encuentra en un proceso de adaptación de protocolos, se han obtenido resultados positivos sobre los cuales se tienen que seguir trabajando para aumentar la tasa de preñez.⁴

La producción de embriones *in vitro* (PIV) es un proceso que implica tres etapas; la maduración *in vitro* (MIV), fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV) de los embriones obtenidos. Los cuales han sido adaptados de protocolos diseñados para vacunos.²

La FIV en alpacas ha venido siendo estudiada en cada una de sus etapas; sin embargo la repetitividad de los resultados aún no ha sido alcanzada. Esto se puede deber a diversos factores biológicos y moleculares diferentes propios de cada especie. No obstante se han obtenido resultados alentadores en todos los trabajos realizados hasta el momento en los centros de investigación tanto universitarios como estatales.

Por otro lado existe la necesidad imperante de seguir el proceso de adaptación de protocolos para la PIV de embriones en alpacas. Así como la evaluación del desarrollo íntegro de estos en condiciones propias donde se aplicarían directamente; esto es en las zonas altoandinas.

HIPÓTESIS

Debido a la capacidad de maduración *in vitro* de ovocitos recuperados de ovarios de animales beneficiados, y la respuesta positiva de los espermatozoides a la capacitación *in vitro*, es probable que modificando un protocolo de fertilización *in vitro* en vacunos, se llegue a obtener un protocolo de fertilización *in vitro* en alpacas con resultados positivos del desarrollo embrionario en estadios avanzados en su ejecución y desarrollo total a 4200 msnm.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Adaptar un protocolo de fertilización *in vitro* para alpacas (*Vicugna pacos*) y evaluarlo a 4200 msnm en el departamento de Puno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar y determinar la técnica de recuperación de ovocitos.
2. Evaluar la recuperación en ovarios con y sin cuerpo lúteo (CL)
3. Evaluar y determinar el tiempo de maduración *in vitro* de los ovocitos para las condiciones hormonales del protocolo base.
4. Evaluar y determinar el método de colección seminal del grupo de alpacas machos de colección.
5. Estandarizar la técnica de la gradiente de densidad con Percoll®
6. Evaluar el efecto de la concentración espermática en la tasa de fertilización.
7. Determinar la tasa de recuperación de ovocitos del protocolo adaptado.
8. Determinar la tasa general de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca para el protocolo adaptado.
9. Determinar la tasa general de fertilización *in vitro* del protocolo adaptado.
10. Determinar la tasa general de desarrollo embrionario del protocolo adaptado.

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. LA ALPACA

2.1.1. Generalidades

La alpaca (*Vicugna pacos*) es uno de los cuatro camélidos sudamericanos (CSA) presentes en nuestro país, el de mayor importancia económica así como el que posee la mayor población y distribución a nivel nacional. La alpaca es un animal que anteriormente radicaba también en la costa peruana, sin embargo, con la llegada de los españoles y la posterior colonización del Perú; esta se vio desplazada a las zonas alto andinas junto con sus criadores, en las cuales a pesar de las condiciones climáticas y la escasez de pastos llegó a adaptarse bastante bien.^{5, 6} En las alpacas se puede distinguir dos razas la huacaya y la suri. La fibra de la alpaca huacaya es áspera y cubre en conjunto dando una forma del vellón esponjosa parecido a las ovejas. En contraste, la fibra de la alpaca suri es lustrosa y flexible lo que en conjunto se puede observar la fibra con una caída desde el lomo hacia abajo.⁷ De estas dos razas la huacaya es la que se encuentra en mayor cantidad. Otra característica importante de la alpaca, es que se considera como una especie de actividad reproductiva estacional, coincidiendo esta con la época de lluvias en la zona altoandina. La alpaca tiene una gestación de 364 días en promedio⁷ aunque se reporta que el intervalo de gestación se encuentra entre los 342 a 350 días.⁶

2.1.2. Importancia Nacional

La alpaca constituye la mayor riqueza pecuaria y genética de las poblaciones andinas en Sudamérica. El estar acostumbrada a ambientes adversos como el altiplano, la convierte en el principal medio de subsistencia de las comunidades campesinas desde el punto de vista económico y alimenticio; con la venta de fibra y el consumo de carne respectivamente.⁶ Según el censo ganadero realizado por el INEI⁸, las alpacas tienen una población de 3685,5 en el Perú, siendo la raza Huacaya la que posee un mayor número

con un 80,4 % de la distribución total; la raza Suri un 12.2% y los cruzados un 7,3%. El mejoramiento genético y aplicación de biotecnologías reproductivas en camélidos ha sido aplicada de manera individual y aislada ⁵. Los CSA son fuente de carne, fibra, y de subproductos como las pieles y cuero que tiene múltiples usos industriales y artesanales que son indispensables para la subsistencia de un amplio sector de estas poblaciones.⁶ El estiércol de estos animales también es empleado como combustible para la cocción de los alimentos y como fertilizante.⁶

2.2. ANATOMÍA REPRODUCTIVA DE LA ALPACA

2.2.1. Anatomía reproductiva de la alpaca hembra

El aparato reproductor de la alpaca hembra está compuesto por los órganos sexuales externos, y órganos sexuales internos. Los ovarios tienen una forma globular irregular^{7, 9, 10}, los folículos entre un tamaño de 5 y 12 mm se consideran normales.^{9, 10} Cuando se realiza un corte del ovario se puede observar una capa externa denominada epitelio germinativo y el interior compuesto por tejido conjuntivo en donde se encuentran los ovocitos contenidos en vesículas denominadas folículos.⁷

El oviducto en la alpaca, es un trayecto rectilíneo que comunica los ovarios con los cuernos uterinos, y está compuesto por 3 partes; itsmo, infundíbulo y ámpula. La alpaca posee un útero bicornio, que está comunicado a los ovarios por oviductos grandes y enrollados que terminan en una bola circundando por completo los ovarios.^{9, 10} El cérvix tiene dos o tres pliegues bien pronunciados con forma anular o espiral irregular.^{7, 9, 10}

La vagina en la alpaca, posee una longitud desde el himen hasta la cérvix de 15 a 25 cm y un diámetro aproximado de 5 cm.¹⁰ Finalmente la vulva y el clítoris siendo este último posible de localizarlo mediante palpaciones entre el meato urinario y la comisura vulvar.⁷ Véase la figura N° 16 en el Anexo 1.1.

2.2.2. Anatomía reproductiva de la alpaca macho

Los órganos reproductivos de las alpacas machos están compuestos principalmente por los testículos, el epidídimo, los órganos accesorios, el pene y prepucio. Los testículos

son pequeños y elípticos y en condiciones normales ambos testículos son del mismo tamaño^{9, 10} aunque varía de acuerdo a la edad; son firmes y con un movimiento libre dentro del escroto el cual posee una forma ovalada y se encuentra dividido por un tabique en medio de las cavidades.^{7, 9, 10}

El epidídimo es un órgano fibroso compacto pegado al borde anterior del testículo, y se puede dividir en tres partes; cabeza, cuerpo y cola. El conjunto deferente es un conducto muy delgado que se origina en la cola del epidídimo y es un órgano par.⁷

Los órganos accesorios como son las glándulas seminales poseen un tamaño medio y forma irregular. La próstata de forma irregular y difusa se ubica dorsolateralmente sobre el cuello de la vejiga.⁹ Las glándulas bulbo uretrales que son ovoides y pequeñas con 1 cm de diámetro. Todos estos producen secreciones que formarán parte del eyaculado.⁷

El pene de los CSA presenta una curvatura sigmoidea, la cual puede ser claramente apreciable cuando el pene del macho no presenta erección. Durante la erección del pene, este puede llegar a alcanzar de 35 a 40 cm de largo.^{7, 9, 10} El glande en la alpaca tiene la forma de un gancho curvo que presenta dos proyecciones o procesos uretrales de aproximadamente 1 cm.^{7, 9} Véase la Figura N° 17 en el Anexo 1.2.

2.3. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA ALPACA

2.3.1. Fisiología reproductiva de la alpaca hembra

La pubertad en la alpaca no puede ser determinada con exactitud, debido a la ovulación inducida que se da post copula. Sin embargo el proceso de ovulación, fertilización, gestación y parto normal se da inicio en algunas hembras a partir de los 12 a 13 meses de edad.^{7, 9} El celo en la alpaca se ve manifestado por la adopción de la posición copulatoria (decúbito ventral) en presencia del macho.^{7, 9}

Las alpacas presentan un celo post-parto a las 24 horas después del parto. El celo en las alpacas es continuo mientras no hayan sido efectivamente servidas; como se explicará más adelante, por lo cual se considera a la alpaca como una especie poliéstrica. En caso de un servicio efectivo, la alpaca presentará un rechazo al macho a los 5 días

posteriores a la ovulación. A partir del día 13 después de la ovulación permanecerán receptivas hasta que se alcance la ovulación.⁷

2.3.1.1. Ovogénesis

El proceso de la ovogénesis comienza en las primeras etapas de la gestación cuando las células germinales primordiales migran a las crestas germinales que originarán los ovarios.¹¹ Las continuas divisiones mitóticas generarán las ovogonias, las mismas que iniciado el proceso de meiosis se convertirán en ovocitos u oocitos. La cantidad de divisiones mitóticas que se producen son especie-específicas.¹¹ Las divisiones meióticas quedan detenidas específicamente en la profase I de la meiosis I como consecuencia del efecto que causa el factor inhibidor de la maduración (MIF) secretado por las células de la granulosa de los folículos primordiales que están en contacto directo con el ovocito.

El ovocito durante el reclutamiento de folículo va creciendo mientras las células de la granulosa comienzan a proliferar bajo el efecto de las gonadotropinas. La división meiótica se reanuda 3 horas después de ocurrida la ovulación, encontrándose en ese momento en la metafase II de la segunda división. La maduración y la meiosis del ovocito no se completan sino hasta que termina la fecundación con la expulsión del segundo cuerpo polar.^{9, 12} Véase la figura N° 18 en el Anexo 2.1

2.3.1.2. Foliculogénesis

Un folículo es una unidad fisiológica equilibrada cuyo funcionamiento y estructura depende de factores hormonales.⁹ La foliculogénesis se puede decir que inicia en la pubertad bajo el efecto de la hormona FSH, la cual induce la mitosis en las células de la granulosa que rodean al ovocito aumentando en número y tamaño. Los folículos iniciales se consideran como folículos primarios, los cuales continúan su crecimiento bajo el efecto hormonal, el mismo que induce a las células de la granulosa a producir un líquido conocido como licor folicular de composición compleja. El licor folicular da como consecuencia la aparición de un espacio entre estas células, llamado antro, que finalmente terminará por rodear casi en su totalidad al ovocito inmaduro para dar origen al folículo

de Graff.^{7,9} El reclutamiento se da en los folículos con un diámetro aproximado de 2 a 3 mm.¹³

La presencia de FSH en el organismo inducirá en las células de la granulosa a parte de la proliferación, la producción de estrógenos como el estradiol, el cual determinará dependiendo de la producción de cada folículo; cual es el seleccionado para la ovulación. El folículo que presente una mayor cantidad de estradiol, conjuntamente desarrollará receptores para la LH en las células de la granulosa, los mismo que servirán para responder adecuadamente al pico pre-ovulatorio de LH.^{9, 12}

2.3.1.3. Ciclos reproductivos

En las alpacas las ondas foliculares tienden a sobreponerse una sobre la otra, teniendo una duración de aproximadamente 11 días⁷ a 12 días⁹, con una alternancia ovárica en más del 80% de veces.⁷ Cuando la dominancia folicular se manifiesta en un ovario, el otro se mantiene quieto.⁷

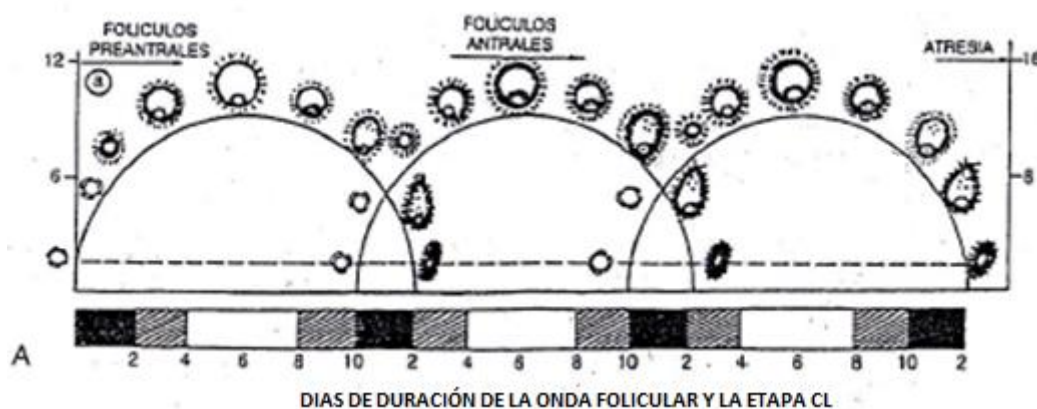


Figura N° 1. Ciclos foliculares de la alpaca.⁹

Todo el ciclo reproductivo comprendido por la onda folicular está compuesto por tres etapas: el crecimiento (4.8 ± 1.5 días), la maduración (5.0 ± 1.6 días) y la regresión (3.2 ± 1.2 días).⁷ Los folículos en las alpacas pueden crecer hasta 6 mm sin demostrar una dominancia, pero superando este valor ya ejerce su dominancia con una superior producción de estrógenos sobre el resto.^{9, 12} Antes de la regresión total de una onda folicular, la otra comienza su desarrollo entre 2 a 3 días antes de la decadencia de la otra.⁷

La alpaca es una especie poliéstrica ya que presenta un estro continuo todo el año con un anestro de 48 horas entre onda y onda. Los ciclos son consecutivos hasta que se presente una ovulación con fertilización e implantación exitosa.⁹

2.3.1.4. Ovulación

La ovulación se produce entre las 24 a 42 horas posteriores a la cópula,^{5, 7} existiendo referencias de un tiempo mínimo de ovulación establecido en 26 horas.⁹ Para que se produzca la ovulación es necesario la estimulación coital mediante la introducción del pene en la vagina y los apretones con las extremidades posteriores del macho, esto provoca la estimulación neural que llega al hipotálamo causando la liberación de la GnRH, la que a su vez causa en la pituitaria la liberación de la LH,⁷ estudios indican que la presencia del semen en el útero de la alpaca induce también la ovulación debido a la presencia de un Factor inductor de la ovulación (OIF).^{6, 9} Por otro lado, la descarga de LH para la ovulación, depende del tamaño folicular, describiéndose que una ovulación normal se produce cuando los folículos son de 7 a 12 mm de tamaño.⁷

La administración de 750 UI de gonadotropina coriónica humana (HcG) o 800 µg de GnRH producen eficientemente la ovulación, siendo esta realizada a las 24 horas.^{7, 9} La aplicación de 1000 y 1500 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) induce el crecimiento folicular múltiple en ovarios de alpacas para lograr la superovulación con fines de producción de embriones *in vivo*.⁴ Como consecuencia de la ovulación se da la presencia del cuerpo lúteo (CL) el cual se mantiene funcional durante toda la gestación o inicia su regresión a los 10 u 11 días en caso no haya quedado preñado el animal.

2.3.1.5. Fecundación *in vivo*

La fertilización en la alpacas es única, motivo por el cual un solo espermatozoide llega a fertilizar un óvulo, y según Bustinza, a las 18 horas los espermatozoides se encuentran en el lugar de la fertilización para iniciar con todo el proceso.⁷ La fertilización en la alpaca consta también de 3 acontecimientos: (a) la migración del espermatozoide entre las células del cúmulus: (b) la fijación y migración a través de la zona pelúcida y finalmente (c) la fusión de las membranas plasmáticas del espermatozoide y óvulo.⁹

Cuando el espermatozoide entra en contacto con las células monticulares o células del cúmulus, se abre paso entre la matriz de ácido hialurónico empleando la hialuronidasa acrosomal; hasta llegar a establecer un contacto entre la cabeza del espermatozoide con las proteínas ZP3 receptoras de la zona pelúcida para lo cual el acrosoma debe estar intacto.^{9, 12}

La penetración del espermatozoide se puede dar de 5 a 15 minutos después de la fijación. Al ocurrir la reacción acrosomal, la liberación de un conjunto de enzimas como la acrosina y la lisina, digieren la cubierta de la zona pelúcida permitiendo el paso del espermatozoide a través de esta, para lo cual se requiere la hipermotilidad espermática adquirida durante la capacitación.^{9, 12}

Una vez atravesada la zona pelúcida, se da el contacto entre la membrana vitelina y el segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide por el cual se unen y seguidamente la región ecuatorial del espermatozoide es incorporada en la membrana plasmática del óvulo dando paso a la formación y subsecuente fusión de los pronúcleos.⁹

Finalmente para concluir impedir el ingreso de más espermatozoides al óvulo, este expulsa al espacio previtelino gránulos corticales los mismos que generarán la liberación de enzimas que endurecerán la zona pelúcida y digerirán los receptores ZP3 y ZP2 necesarios para la unión óvulo-espermatozoide.^{9, 12}

2.3.1.6. Desarrollo embrionario

Después de la fusión de ambos pronúcleos y de haberse producido la singamia en la etapa de cigoto, el embrión inicia las divisiones mitóticas sin aumentar la masa celular, dando inicio a la segmentación. La segmentación consiste en las continuas, consecutivas y sincronizadas divisiones mitóticas que emprende el embrión en pequeñas células denominadas blastómeros. Las divisiones son exponenciales siempre en un número par, es decir en la segunda se llegarán a los 4 blastómeros, a la tercera a los 8 blastómeros y así consecutivamente. Cuando el embrión alcanza los 16 blastómeros aproximadamente, se denomina mórula y a partir de ahí en adelante se aumentará la tasa de metabolismo.^{9, 12}

Al alcanzar las 32 células el embrión, se produce un fenómeno denominado compactación; que consiste en el aplastamiento y la polarización de los blastómeros

forzando a los fluidos intraembrionarios a ubicarse en el interior de este, dando origen al blastocele. Los blastómeros sufren una diferenciación debido a su ubicación, ya que un conjunto de estos se encuentra agrupado en la parte interior formando un botón que se denominará nódulo embrionario (que dará origen al embrión propiamente dicho) y el resto de blastómeros ubicados periféricamente que formarán el trofoectodermo o trofoblasto. Es entonces cuando el embrión toma el nombre de blastocisto.^{9, 12}

Aproximadamente al día 6 o 7; las contracciones del embrión, el aumento de líquido del blastocele y del propio embrión, provocan que la zona pelúcida expuesta ya a los efectos de las secreciones uterinas; sea debilitada y se produzca su ruptura y la consecuente liberación del blastocisto, proceso conocido como eclosión, quedando el embrión libre para producirse la implantación y continuar con el proceso de gestación.^{9, 12}

En la alpaca la implantación se realiza en el tercio medio, y casi invariablemente en el cuerno uterino izquierdo (98.4%) ¹⁴ siendo esto independiente del ovario que haya presentado la ovulación. La implantación ocurre dentro de los primeros 20 a 22 días pero no más tarde que los 30 días después de la cópula.⁷

El crecimiento del embrión es en pequeña escala hasta los 160 días, luego los incrementos de peso son acelerados hasta los 250 días, y de ahí para adelante son muy rápidos.⁷ Véase la figura N° 22 en el Anexo 2.2.

2.3.2. Fisiología reproductiva de la alpaca macho

Los machos manifiestan su actividad sexual a los 12 meses de edad, sin embargo hasta los 3 años presenta adherencias del pene prepuciales, lo cual imposibilita de un servicio efectivo a la hembra.^{7, 9, 10} A medida que el macho crece las adherencias van desapareciendo debido al inicio de la producción de testosterona. Finalmente se quedó establecido que la madurez sexual aparece recién a los dos y en forma completa a los tres años de edad.^{7, 10}

En cuanto a la duración de la cópula esta generalmente es prolongada con un promedio de 15 minutos aproximadamente, con una variación que puede ir desde los 5 hasta los 50 minutos.^{6, 7}

2.3.2.1. Espermatoogénesis

Los espermatozoides las células sexuales del macho que están conformados por cabeza, cuello y cola. En la cabeza disponen en el extremo anterior al núcleo el acrosoma, un pequeño saco membranoso que contiene un grupo de enzimas hidrolíticas importantes para el proceso de fecundación.^{7, 9} El proceso de generación de nuevos espermatozoides se puede dividir en dos claras etapas: la espermatoogénesis y la espermiogénesis.⁹

En la espermatoogénesis; las células germinales primordiales que se encuentran en los túbulos seminíferos sufren divisiones consecutivas que generarán los gonocitos, los mismos que por diferenciación formarán los espermatoogonios AO y bajo un conjunto de nuevas divisiones llegarán a formar los espermatoocitos primarios y posteriormente los secundarios. Los espermatoocitos secundarios se dividirán nuevamente para convertirse en células haploides, dando lugar a las espermátides.^{9, 12}

Finalmente en la espermiogénesis se suscitan cambios morfológicos basados en la condensación de la cromátide, la formación del flagelo y del casquete acrosomal.^{9, 12} Los espermatozoides finalmente son separados de las células de Sertoli y almacenados en la cola del epidídimo; en la cual maduran y desarrollan su motilidad.^{9, 12} En las alpacas se han realizado cortes histológicos donde se ha visualizado los primeros espermatozoides a los 18 meses de edad.⁷ Véase la Figura N° 20 y 21 en el Anexo 2.1.

2.3.2.2. Características del semen

El semen de alpaca, está constituido el 85% por el plasma seminal y el 15% por los espermatozoides. La coloración varía del color cristalino al blanco lechoso dependiendo de la concentración espermática,^{7,9} y con una alta viscosidad que impide el movimiento progresivo de los espermatozoides, por lo cual no presenta una motilidad masal.^{7,9} El pH del semen se puede encontrar entre 7 a 8 con un valor promedio de 7.2.^{7,9,10} En cuanto al volumen, este varía muchísimo de acuerdo a la técnica de obtención utilizada, la individualidad, y de una concentración a otra, oscilando entre 1 a 15 ml.¹⁰

El semen de alpacas al ser muy sensible y frágil, requiere del uso de dilutores, el mismo que permitirán proteger la integridad del espermatozoide y mantener su viabilidad.¹⁵

2.3.2.3. Capacitación del espermatozoide

La capacitación espermática es un proceso que se realiza en el tracto reproductor de la hembra durante la permanencia de los espermatozoides en esta, la cual le permite al espermatozoide penetrar el óvulo satisfactoriamente.

La capacitación consiste en la eliminación o modificación de ciertos componentes de la superficie del espermatozoide como colesterol o glucosaminoglucanos, permitiendo la desestabilización de la bicapa fosfolipídica para la posterior activación acrosomal. Tanto los componentes protectores, como el contacto con las secreciones uterinas; evitan la activación prematura del acrosoma antes de haber llegado al óvulo.^{9, 12}

Otra de las características que adquiere el espermatozoide durante la capacitación, es la adquisición de un movimiento característico, rectilíneo como consecuencia del latido flagelar, conocido como hiperactivación espermática.¹²

2.3.2.4. Reacción acrosomal

La reacción acrosomal consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana externa del acrosoma. Como resultado de esta fusión, del acrosoma se liberan enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa y acrosina que permitirán el correcto ingreso del espermatozoide al óvulo.^{9, 12}

2.4. MADURACIÓN IN VITRO

2.4.1. Recolección y transporte de ovarios

La fuente de obtención de los ovarios puede ser de hembras ovariectomizadas, de donde se obtienen con mejores condiciones de higiene y su respectiva identificación. También se pueden obtener después de la faena en los centros de beneficio siendo esta la forma más común y económica para fines experimentales y comerciales.

O siendo el caso de hembras con problemas reproductivos y de gran valor genético, donde no es necesario beneficiar al animal, al emplear el método de aspiración transvaginal (OPU) con el animal vivo.^{16, 17}

El transporte de los ovarios de puede realizar en solución fisiológica o PBS a temperatura ambiente¹⁶, aunque lo más recomendable es mantenerlos a temperatura fisiológica entre 36 a 37.5°C. El tiempo de transporte comprendido hasta las 11 horas no influye en la vitalidad de los ovocitos.¹⁶

Un trabajo realizado por Huanca et al ⁵ en el 2007 probó dos temperaturas de transporte a 4° y 35° C determinó que se obtienen ovocitos de mejor calidad bajo un transporte a 35°C.

2.4.2. Recuperación de los ovocitos

La recuperación de ovocitos de los ovarios puede realizarse bajo diferentes metodologías, sin embargo solamente se describirán las más empleadas y que presentan mejores resultados. Para esto hay que tomar en cuenta que el tiempo de recuperación debe ser el menor posible.

Otras tecnologías como aspiración de folículos vía laparotomía y la punción transvaginal guiada con ecógrafo (OPU) permiten obtener altas tasas de recuperación de ovocitos de animales de buena calidad genética con el fin de emplearlos en FIV.^{17, 18}

2.4.2.1. Técnica de slicing

La técnica conocida como slicing o disección folicular consiste en realizar cortes en la superficie del folículo para permitir la liberación del ovocito contenido.¹⁷ Esta técnica se ha aplicado en diferentes trabajos de investigación para obtener ovocitos para su uso en procedimientos de FIV.

Los resultados de esta recuperación han sido favorables al recuperar una buena cantidad de ovocitos en categoría I y II.

La técnica de recuperación por slicing permite un mayor rendimiento en la recuperación de los ovocitos, siendo estos de manera homogénea.¹⁹

2.4.2.2. Técnica de aspiración

La aspiración de los COCs es el método más simple y comúnmente empleado, para lo cual se usan jeringas con agujas que pueden variar de 18G a 21G con 2.5 cm de largo.²⁰

La punción de los folículos se hace en forma lateral y con el bisel hacia arriba. El contenido folicular aspirado es colocado en un tubo falcon para su decantación por aproximadamente 10 minutos, al término se retira el sobrenadante y el precipitado se coloca en una placa Petri para la búsqueda y selección de los ovocitos. En caso de realizar la aspiración con una bomba de vacío la presión de esta debe ser regulada.¹⁶

2.4.3. Selección de ovocitos

En los ovocitos recuperados de ovarios de matadero o de cualquiera de las fuentes antes mencionada, varían en apariencia (aspecto del citoplasma y del cúmulus) y en su morfología. Es por ese motivo que diversos autores han determinado que el tamaño del ovocito así como la morfología de los COCs son criterios válidos para seleccionar los ovocitos más adecuados para el proceso de PIVE.¹⁶

2.4.3.1. Capas de células del cúmulus (CCs)

Esta es una característica muy fácil para diferenciar aquellos ovocitos competentes de aquellos que no podría progresar, para esto se evalúa la constitución y morfología del cúmulus. Las CCs es una subpoblación de las células de la granulosa folicular que se encuentran próximas al ovocito. Los ovocitos de folículos atrésicos presentan las CCs menos compactadas al ovocito y por ende un menor número de capas.

Los COCs de mejor calidad son aquellos conformados por un cúmulus compacto de color gris o marrón uniformemente oscuro.^{16, 20} La presencia de las CCs es necesaria debido a que ayudan a la maduración citoplasmática y mejora la fecundación ya que pueden dirigir a los espermatozoides hacia el ovocito.^{11, 16}

2.4.3.2. Integridad del citoplasma

Otro aspecto de igual e inclusive mayor importancia es la integridad del citoplasma debido a que en este se encuentran las organelas necesarias que permitirán la formación del pronúcleo masculino^{9, 12} y contienen el material genético necesario para realizar la singamia. El citoplasma de los ovocitos debe ser de un color marrón o gris uniforme¹⁶ tanto morfológicamente (de estructura circular homogénea) como pignóticamente (sin

presentar vesículas pigmentadas). Los ovocitos con ovoplasma oscuro presentan acumulación de lípidos y un buen potencial para el desarrollo.²

Tabla N° 1. Criterios de selección de COCs y ovocitos según Hawk y Wall (1994)¹⁶

Categoría	Característica
Buena	Cúmulus con capas múltiples, compacto pero traslúcido Citoplasma con granulación fina, densa y uniforme.
Regular	Cúmulus ligeramente expandido, con menor número de capas que pueden cubrir la mitad de la ZP, granulaciones ligeramente más gruesas.
Mala	Ovocitos pequeños o grandes, ovocitos desnudos. Cúmulus muy oscuro (marrón oscuro, negro) Citoplasma de color muy claro o negro Citoplasma bueno con áreas muy claras o muy oscuras.

2.4.4. Medios de maduración *in vitro*

Actualmente en el mercado se disponen de diferentes medios de cultivo para la maduración *in vitro* de ovocitos, teniendo todos estos medios aproximadamente la misma composición. Uno de los medios más empleados y con resultados favorables es el Tissue Culture Medium 199 (TCM 199) compuesto por sales de Earl´s con HEPES y bicarbonato como estabilizante de pH; suplementado con piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, y proteínas (albúmina bovina o suero).¹⁶ Por otro lado estudios realizados por Herradón indican que se puede considerar otros medios como el fluido oviductal sintético (SOF) con resultados similares a los obtenidos en TCM.²

2.4.5. Condiciones para la maduración *in vitro*

2.4.5.1. Temperatura

La temperatura empleada para el cultivo de los ovocitos generalmente coincide en todos los trabajos realizados tanto en camélidos como en otras especies como bovinos. Esta debe estar fijada a 38.5 °C y regulada por la incubadora por el periodo que dure todo el proceso de PIV. Los cambios de temperatura son muy considerables para el desarrollo de los embriones, sobre todo durante el estadio de ovocito.

2.4.5.2. Atmosfera gaseosa

Para el cultivo de los embriones son comúnmente utilizados dos tipos de ambientes gaseosos. En algunos casos se emplea el cultivo en cámara con 5% de CO₂ y 95% de aire.¹⁹ En otros casos también se emplea una atmósfera con mezcla de gases, es decir 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂. Esto responde principalmente a la escasa cantidad de oxígeno en el tracto reproductor de la hembra, el cual en cantidades superiores puede generar la intoxicación del embrión debido a las sustancias reactivas de oxígeno (ROS).²

2.4.5.3. Osmolaridad y pH

La osmolaridad en el medio de cultivo debe encontrarse entre 275 y 285 mOsm la condición ligeramente hipotónica del medio es para compensar la evaporación durante la incubación.¹⁶ Los cambios en la osmolaridad pueden generar cambios o alteraciones en cuanto al diámetro y la calidad de los embriones.²¹

El pH del medio debe mantenerse entre los valores del plasma sanguíneo en un rango de neutralidad aproximadamente a 7.4, es por eso que el medio contiene bicarbonato de sodio, y HEPES para regular las variaciones de alcalinidad y acides propias del metabolismo de las células.¹⁶ Como indicador el medio contiene rojo fenol el cual mediante coloración nos dará una idea del valor de pH del medio.

2.4.5.4. Tiempo de maduración

Un estudio realizado con ovocitos obtenidos de ovarios de matadero y madurados a 38.5°C y 5% de CO₂, obtuvo una alta tasa de ovocitos en MII (62%) a las 32 horas de incubación.⁵ Sin embargo, los tiempos de maduración pueden ser variables de acuerdo a la combinación de hormonas que se emplee, pero generalmente para las alpacas la maduración *in vitro* se encuentra sobre las 30 horas de cultivo.

2.4.5.5. Sistema de cultivo para maduración *in vitro*

Los sistemas de cultivo para la maduración *in vitro* como en el resto de cultivos, debe ser establecido previamente en el diseño de la metodología. Se puede realizar la

maduración en soporte físico sobre el que se realiza la maduración; esto puede ser en placas o tubos. Así como también la densidad de los ovocitos por volumen de medio y si el cultivo se realizará de manera estática o con un ligero movimiento.²²

2.4.6. Suplementación del medio de maduración

2.4.6.1. Hormonas

Las hormonas más comúnmente empleadas debido a su influencia en la maduración del ovocito *in vivo*, son las gonadotropinas exógenas como la FSH y la LH. Ambas hormonas presentan efectos positivos en la reanudación de la meiosis del ovocito para alcanzar la metafase II. Por otro lado como se conoce, la FSH induce el desarrollo de receptores para LH lo cual impulsará la secreción de estrógenos y conjuntamente inducir la proliferación y desarrollo de las células de la granulosa, las cuales al estar conectadas directamente con el ovocito, favorecerán el transporte de nutrientes y su maduración.¹⁶

2.4.6.2. Antibióticos

Los antibióticos y antimicóticos son empleados en diferentes protocolos de fertilización *in vitro*. En el transporte de los ovarios la solución salina contiene diversos antibióticos y antimicóticos (kanamicina, penicilina y gentamicina) que evitan la contaminación de la muestra que muchas veces es traída de camales o centros de beneficio.²⁰

2.4.6.3. Proteínas

Dentro del suplemento proteico se emplean principalmente la albúmina sérica bovina (BSA) y el suero fetal bovino (FCS). Ambos complementos orgánicos son empleados en los medios para una producción con alta tasa de blastocistos, esto debido a facilitan el transporte de fluidos a través de la membrana celular, así también favorecen la expansión de las células del cúmulus y el reinicio de la meiosis. Una característica del

FCS es que contiene ciertos factores que pueden inhibir el desarrollo del ovocito como las globulinas, es por este motivo que el suero debe ser previamente inactivado.¹⁶

2.5. FECUNDACIÓN IN VITRO

2.5.1. Colección de semen

Según Bustinza los métodos de colección de semen, deben guardar cierta relación con el comportamiento sexual de los machos; siendo la posición coital que adopta y el temperamento nervioso, factores que dificultan la colección.⁷ Debido a esta característica son diferentes las técnicas y métodos de colección que se emplean en alpacas, siendo las principales las que se tocarán a continuación.

La electroeyaculación es un método que ha ofrecido buenos resultados; el tiempo necesario para la eyaculación es mucho más corto; no es necesario el uso de alpacas hembras y se puede realizar en cualquier época del año. Sin embargo una de las principales limitaciones es la contaminación del semen con la orina, así como la excesiva dilución del semen debido a la secreción de las glándulas accesorias, y finalmente este método presenta mucha variación individual en la respuesta.⁷

La colección empleando vagina artificial ha presentado los mejores resultados en la colecta de semen y es la más empleada. La principal ventaja es que permite que el macho monte el maniquí y eyacule en el periodo que lo realiza naturalmente además que una adecuada manipulación y control de la temperatura evita que el semen sufra cambios dramáticos que disminuyan su viabilidad.⁷

También existen otros métodos de obtención de semen de manera quirúrgica como la desviación de los conductos deferentes lo cual resulta más invasivo al animal.

2.5.2. Métodos de selección espermática

La selección espermática permite la separación de los espermatozoides con morfología normal, una buena motilidad e integridad del material genético del resto de la población, así como de los diferentes componentes del eyaculado.¹⁹

2.5.2.1. Técnica de gradiente de densidad

El fundamento de esta técnica está en los principios básicos de la teoría de la sedimentación, los cuales derivan de la Ley de Stokes. Este método requiere de una solución cuya densidad aumenta desde la zona superior hacia la inferior. Los espermatozoides son colocados en la superficie y con la centrifugación son desplazados hasta un punto donde su densidad es igual a la de la gradiente. Como resultados los espermatozoides intactos que poseen una mayor densidad se ubicarán en el fondo del tubo. Dentro de los reactivos más empleados para preparar las gradiente se encuentra el Ficoll y el Percoll®, siendo este último empleado en concentraciones de 90%, 45% o 30% en sus diferentes combinaciones.¹⁶

2.5.2.2. Técnica de swim up

La técnica desarrollada por Parrish en 1984 se basa en la capacidad migratoria del espermatozoide en condiciones de incubación a 39°C. Consiste en un conjunto de incubaciones y lavados en medio de cultivo Tirodes-lactato modificado (TALP) suplementado con factores energéticos, que permitirán la migración de los espermatozoides que se encuentren en buenas condiciones y con una adecuada motilidad, desde la base del tubo donde son colocados inicialmente, hasta la superficie del medio.¹⁶

2.5.3. Agentes de la capacitación espermática *in vitro*

2.5.3.1. Agentes de capacitación y reacción acrosómica

Diferentes componentes como la albúmina sérica bovina (BSA) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) permiten la liberación de los agentes incapacitantes como el colesterol de la cabeza del espermatozoide. La heparina es otro componente comúnmente empleado para desencadenar la capacitación *in vitro* en bovinos, que finalizará con la correcta reacción acrosómica y penetración en el ovocito.²

También se ha encontrado que el uso de la catecolamina adrenalina y la hipotaurina incrementan la penetración.¹⁶

2.5.4. Medios de fertilización *in vitro*

Los medios generalmente usados son medio Tyrode suplementado en diferentes cantidades con fuentes energéticas como piruvato, lactato y albúmina sérica. En algunos casos en la PIVE bovinos se ha añadido heparina al medio directamente pero es necesario ajustar la concentración de heparina y el número de espermatozoides.²

2.5.4.1. Tiempo de co-cultivo de los gametos

El tiempo empleado para la fertilización de los ovocitos, generalmente se encuentra en 18 horas, tomando como referencia el tiempo empleado en bovinos. Este tiempo puede ser mayor o menor siempre y cuando se tomen en cuenta la concentración espermática y sucesos como presencia de polispermia.^{22, 23}

2.5.4.2. Condiciones de co-cultivo

En algunos trabajos realizados, se considera el co-cultivo de los espermatozoides y del ovocito con células de oviducto para obtener un mejor desarrollo.¹⁹ Las condiciones de cultivo en cámara generalmente se mantienen dentro de las anteriormente establecidas, a 38.5 °C, alta humedad, y la atmosfera gaseosa de 5%CO₂, y 21 % O₂ en el aire. Aunque se ha demostrado que el uso de mezcla de gases permite una mejor calidad de embriones en bovinos

2.6. CULTIVO DE EMBRIONES IN VITRO

2.6.1. Selección de embriones viables

Para el cultivo embrionario se deben tomar en cuenta solamente a los cigotos que posean blastómeros definidos, tanto en morfologías así como en aspecto de estas. Los cigotos u ovocitos que no hayan sido fertilizados, siendo esto manifestado por la extrusión del segundo corpúsculo polar, deben evitar ser cultivados debido a que al iniciar su degeneración pueden liberar sustancias reactivas de oxígeno (ROS) generando un estrés oxidativo sobre el resto de embriones y afectar su desarrollo normal.

2.6.2. Medios de cultivo embrionario *in vitro*

Los medios de cultivo para embriones más empleados son el medio SOFaa, KSOMaa y el CR-1.¹⁶ Como se explicó anteriormente la osmolaridad debe encontrarse entre los 270 y los 300 mOsm. En cuanto al pH del medio debe variar entre 7.2 y 7.4, regulado por el sistema HCO_3/CO_2 .

Es de conocimiento que el desarrollo embrionario modifica su metabolismo especialmente a partir del estadio de mórula para adelante cuando la función oxidativa adquiere una mayor importancia. La fosforilación oxidativa empleando el piruvato y aminoácidos es la principal fuente de energía durante los 3 primeros días de desarrollo, siendo posteriormente cambiada por la glucólisis desde el 4 día en adelante hasta el estadio de blastocisto.¹⁶

Diferentes estudios revelan que la glucosa tiene un efecto negativo en el desarrollo temprano de los embriones siendo esta beneficiosa en los estadios más avanzados.

La suplementación de los medios con aminoácidos, permiten aumentar el desarrollo embrionario durante la división, regular el incremento o disminución del volumen celular, y favorecer el desarrollo embrionario con miras a su implantación.¹⁶ El suero al ser una mezcla compleja de biomoléculas es más beneficioso durante el desarrollo embrionario desde el estadio de mórula en adelante.¹⁶

2.6.3. Condiciones y sistema de cultivo embrionario *in vitro*

Las condiciones de cultivo embrionario dado en la incubadora se mantienen casi idénticas al cultivo para la MIV. La temperatura debe estar mantenida y regularizada a 38.5°C durante todo el cultivo y sin variaciones, así como la humedad debe ser mantenida al 100% dentro de la cámara.

En cuanto a la atmósfera gaseosa las más empleadas son las que contiene 5% de CO_2 en el aire o la compuesta por 5% CO_2 , 5% O_2 y 90% de N_2 .²

Los sistemas de cultivo pueden ser continuos con el mismo medio de cultivo durante los 7 días de CIV o puede haber un cambio de medio (de KSOMaa a SOFaa) al 3 día, ya que se ha demostrado que el uso de medio SOFaa permite la obtención de embriones de mejor calidad.^{2,24} El cultivo embrionario puede darse en gotas o en pocillo,

tomando en cuenta la relación medio – número de embriones que se debe mantener para poder evitar la competencia por los sustratos, y favorecer el sinergismo en el desarrollo embrionario.¹⁶

2.6.4. Criterios de clasificación y evaluación embrionaria

La evaluación embrionaria se puede dar en dos aspectos: uno cuantitativo y otro cualitativo. En el aspecto cuantitativo, se toma el número de embriones que desarrollan en los diferentes momentos del cultivo, sobre el número de cigotos cultivados para la maduración o divididos el día 1 después de la fecundación, expresado en porcentaje.¹⁶

$$\% \text{ Desarrollo Embrionario} = \frac{N^{\circ} \text{ embriones divididos}}{N^{\circ} \text{ cigotos cultivados}} \times 100$$

Por otro lado la capacidad del embrión para generar una gestación puede ser considerado como: calidad, vitalidad o viabilidad, y esta puede ser medida por 5 estudios.

- **Morfología:**
Tomando en cuenta el aspecto de los blastómeros tanto en su conformación como en su apariencia.
- **Desarrollo *in vitro*:**
Esta es tomada como una medida numérica de la eficacia de la producción de embriones, expresando en proporciones los estadios alcanzados en división de 2 blastómeros al segundo día, mórulas y blastocistos al séptimo día y finalmente también al séptimo día los blastocistos eclosionados.
- **Coloración diferencial:**
Se basa en establecer la integridad de la membrana del blastómero, así como la presencia de núcleos en las células embrionarias empleando diversos colorantes.

- Metabolismo embrionario:

Consiste en evaluar la actividad metabólica de la glucosa embrionaria para determinar la capacidad de desarrollo de los embriones.

2.6.5. Desarrollo embrionario *in vitro*

En diferentes evaluaciones realizadas a embriones producidos *in vivo* e *in vitro*, se encontraron significativas diferencias en la morfología, permeabilidad de la membrana, densidad, número de células y características de la zona pelúcida. Por otro lado se determinó que los embriones PIV tienen una menor viabilidad, así como presentaron alteraciones morfológicas, bioquímicas y metabólicas. También presentaron una mayor susceptibilidad al enfriamiento y criopreservación.^{16, 23}

Sin embargo una característica importante es que los embriones PIV alcanzan el estadio de desarrollo con una anterioridad de 1 día respecto a los embriones *in vivo*, siendo indicados la temperatura y el suero como los factores inductores del desarrollo acelerado.¹⁶ De todas maneras existen escasas referencias en cuanto a la PIV de embriones en camélidos y el desarrollo embrionario de estos ha permanecido bajo en comparación con otras especies.¹⁷

2.7. BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS AFINES

2.7.1. Transferencia de embriones

La transferencia de embriones tiene su primer reporte realizado por Sumar et al en 1974, y trabajos posteriores realizados en Perú confirman los resultados positivos y la factibilidad de la técnica. Los resultados de la transferencia de embriones responden a diferentes protocolos de sincronización con hormonas exógenas. La recuperación de los embriones puede ser realizada de manera quirúrgica (laparotomía y laparoscopia) y no quirúrgica (lavado de los cuernos). La técnica consiste en la recuperación de embriones de las hembras donadoras por lavado a los 7 u 8 días post-fertilización, y la transferencia de estos a hembras receptoras previamente sincronizadas, las cuales serán las encargadas de llevar la preñez hasta el término.²⁵

2.7.2. Vitricación de embriones

Es una técnica que permite la conservación de los embriones que pueden ser obtenidos *in vivo* o *in vitro*. La vitricación consiste en el congelamiento rápido de los embriones lo cual la convierte en una técnica rápida y moderadamente sencilla. La técnica consiste en el pase de los embriones seleccionados a través de tres soluciones vitrificantes, las cuales desplazarán el agua del embrión evitando la formación de cristales.²⁵



CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

3.1.1. Ubicación

El trabajo experimental se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva del Centro de Innovación y Producción (CIP) Quimsachata, el cual pertenece a la Estación Experimental Agraria Illpa – Puno.

El CIP – Quimsachata está ubicado a 4200 m.s.n.m. en el distrito de Santa Lucía, provincia de Lampa en el departamento de Puno, Perú (15° 41'39'' LS, 70°36'24'' LW).

3.1.2. Condiciones ambientales

El CIP Quimsachata se encuentra ubicado en la zona agroecológica conocida como puna seca en la cordillera de los Andes Occidentales; caracterizada por tener poca vegetación y baja precipitación pluvial. Presenta como factores ambientales; bajas temperaturas con una pronunciada variación durante el día, presencia de heladas frecuentes. Así como precipitaciones irregulares en forma de lluvia, nieve o granizo

Presenta una temperatura mínima de -4.7°C y una máxima de 13.2°C, con una humedad relativa ambiente de 55%.²⁶

3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

3.2.1. Fuente de recolección de ovarios

Los ovarios fueron recolectados de diferentes hembras sacrificadas en el camal municipal (CM) de Nuñoa en la provincia de Melgar, y los centros de beneficio familiar (CBF) del distrito de Santa Lucía en la provincia de Lampa; ambos en el departamento de Puno.

3.2.2. Fuente de obtención de semen

El semen fue colectado de diferentes machos donadores de las majadas del CIP. Quimsachata, los cuales fueron previamente seleccionados y trasladados al centro de investigación para su adecuada alimentación, monitoreo respectivo y colección.

3.3. MATERIALES

3.3.1. Material biológico

- Ovarios de alpaca (*Vicugna pacos*) hembra
- Semen de alpaca (*Vicugna pacos*) macho

3.3.2. Material de vidrio

- Probetas (100; 250; 500 ml)
- Frascos Roux (80; 200; 1000 ml)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Beakers (50; 100; 250 ml)

3.3.3. Material de plástico

- Jeringas (2; 5; 10; 20 ml)
- Tips (10; 200; 1000 μ l)
- Racs
- Pipetas (10 ml)
- Filtros millipore (22 μ m)
- Viales (2 ml)
- Tubos Eppendorf
- Placas petri grandes
- Placas petri pequeñas
- Placas de pocillo (4 y 6 pocillos)

3.3.4. Reactivos

- Ácido Láctico (Sigma I4263-500ML)
- Aminoácidos Esenciales (Sigma M5550)
- Aminoácidos No Esenciales (Sigma M7145)
- BSA Factor V (Sigma A4503-100G)
- BSA FAF (Sigma A6003-5G)
- Carbonato de Sodio (NaHCO_3 , Sigma S5761-500G)
- Cloruro de Calcio (CaCl_2 , Sigma C7902-500G)
- Cloruro de Magnesio (MgCl_2 , Sigma M2393-500G)
- Cloruro de Potasio (KCl; Sigma P5405-250G)
- Cloruro de Sodio (NaCl; Sigma S5886-1KG)
- EDTA
- Epinefrina (Sigma E4250-10G)
- Estradiol ($17\text{-}\beta$, Sigma E2758-1G)
- Fosfato Ácido de Potasio (KH_2PO_4 ; Sigma P5655-500G)
- Fosfato Ácido de Sodio (NaH_2PO_4 , Sigma S5011-100G)
- FSH (Folltropin)
- Gentamicina (Sigma G1264-5G)
- Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, Sigma G1264-5G)
- HcG (Sigma CG5-1VL)
- Heparina (Sigma H3149-25KU)
- HEPES (Sigma H4034-100G)
- Hipotaurina (Sigma H1384-1G)
- L-Glutamina (Sigma G3126-100G)
- Percoll (Sigma P1644-1L)
- Piruvato (Sigma P5280-25G)
- Rojo Fenol (Sigma P3532-25G)
- FCS
- Sulfato Magnesio Hepta hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma 230391-500G)
- TCM – 199 (Sigma M7528)

3.3.5. Equipos

- Balanza analítica
- Centrífuga
- Incubadora CO₂
- Baño termostático
- Estufa
- Microscopio
- Estereoscopio
- Platina térmica
- Cámara de flujo laminar
- Refrigeradora
- Vórtex
- pH-metro
- Propipeta automática
- Destilador
- Purificador de agua mili-Q
- Autoclave
- Cocina a gas
- Termómetro
- Electroeyaculador
- Micropipetas (1; 10; 200; 1000 µl)

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. Recolección y transporte de los ovarios

Los ovarios fueron recolectados del camal municipal de Nuñoa en la provincia de Melgar, y de los centros de beneficio familiar de Santa Lucía en la provincia de Lampa, ambos en el departamento de Puno.

La recolección se realizó al momento del sacrificio del animal, cuando los ovarios eran expuestos al medio ambiente. En este momento fueron cortados y colocados

inmediatamente en el medio de transporte para su conservación. La temperatura del termo con el medio de transporte se manejó cuidadosamente para mantenerla en un rango de 37 a 38.5 °C. Para la recolección de ovarios no se tomó en cuenta ningún estado de salud o registro reproductivo de la hembra. El traslado desde los centros de beneficio, tanto de Nuñoa como de Santa Lucía al CIP. Quimsachata se realizó haciendo uso del transporte público de la zona, procurando que el tiempo de viaje sea el mínimo posible.

3.4.2. Limpieza y selección de los ovarios de trabajo

Una vez que el termo llegaba al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva del CIP, se procedía a llenar la hoja de registro de las muestras. Los ovarios se colocaron en un beaker con medio de transporte renovado, previamente temperado en Baño María a 38.5°C. Durante el traspaso de los ovarios se realizó la separación del excedente de tejido con el cual se encontraban, así como el conteo del número total de ovarios sin cuerpo lúteo (CL) como los ovarios con CL.

Ya en el beaker se realizaron de tres a cuatro lavados (variable) con el medio de transporte, se realizó un ligero masaje en cada lavado sobre todos los ovarios con el fin de eliminar contaminación o presencia de diferentes fluidos; hasta que el medio en el beaker no presentó una coloración rosada debido a la presencia de fluido sanguíneo.

La selección de los ovarios de trabajo, se realizó basándose en la presencia de: folículos superficiales, folículos hemorrágicos, cuerpos lúteos, así como tamaño y características propias de cada ovario. Finalmente los ovarios seleccionados para la siguiente etapa, fueron clasificados en ovarios con CL y ovarios sin CL; y separados en dos beakers con medio de lavado previamente temperado a 38.5°C para evaluar la tasa de recuperación de ovocitos en cada grupo. Todo el procedimiento y el manejo de los medios se realizaron en Baño María a 38.5°C.

3.4.3. Recuperación de los ovocitos

De todos los ovarios seleccionados en el procedimiento anterior, fueron llevados a la mesa de trabajo los primeros tres, en un beaker de 50 ml con aproximadamente 30 ml de Medio de Lavado previamente temperado a 38.5°C en Baño María.

La técnica de aspiración se realizó empleando una jeringa con aguja 21G, con la cual se punzó cerca a los folículos seleccionados de forma horizontal con el bisel hacia arriba. Una vez que la aguja se encontraba en el folículo, se aspiró todo el contenido realizando un suave movimiento para permitir el desprendimiento del COCs. El contenido folicular aspirado se colocó en un tubo falcon de 15 ml por 10 minutos para la sedimentación de la carga celular. Transcurrido este tiempo, se eliminó todo el sobrenadante con una pipeta Pasteur, y el sedimento se colocó en una placa Petri para la visualización y clasificación de los ovocitos recuperados.

Para la recuperación de los ovocitos por la técnica de slicing se realizaron algunas modificaciones. El slicing se realizó en una placa Petri descartable, en la cual se colocó un volumen de medio de lavado previamente temperado en baño maría. Los cortes se realizaron bajo visualización en estereoscopio, con platina térmica. El ovario se sujetó firmemente con una pinza y con un bisturí de hoja 21, con el cual se realizó un corte longitudinal para poder liberar el contenido folicular.

Los ovocitos conforme eran recuperados, fueron rápidamente colocados en placas Petri pequeñas con medio de lavado, empleando una micropipeta de 10 μ l. Cuando se concluyó la extracción en los tres ovarios iniciales, se realizó el mismo procedimiento con los otros tres siguientes y así sucesivamente hasta terminar la extracción en todos los ovarios.

Parámetros de recuperación:

- La recuperación se realizó en ovarios sin cuerpo lúteo y con cuerpo lúteo por separado para evaluar la tasa y calidad de los ovocitos recuperados, para determinar con cuales se priorizará la recuperación.
- Se realizó la recuperación solamente de los folículos que presentaban las siguientes características: un buen tamaño, no hemorrágicos y que se encuentren visiblemente en la superficie del ovario.
- Los ovarios que no eran trabajados en ese momento, permanecieron en el beaker con medio de lavado en otra platina térmica en la mesa de trabajo cercana al estereoscopio.

3.4.4. Clasificación de los ovocitos

La clasificación de los ovocitos consistió en dos etapas de rigurosa selección:

3.4.4.1. Primera clasificación:

Se evaluó la condición general del ovocitos, así como el número de capas de células del cúmulus bajo visualización en estereoscopio. Una vez realizada la clasificación, se colocaron en 4 placas Petri pequeñas con medio de lavado, previamente rotuladas como se muestra en la tabla N° 10.

Tabla N° 2. Parámetros de la primera clasificación

Placa	Características
A	COCs con más de 4 capas de células del cúmulus y cubierto homogéneamente.
B	COCs con 2 a 4 capas de células del cúmulus y/o cubierto parcialmente.
C	COCs con menos de 2 capas de células del cúmulus o desnudados.
D	COCs indeterminados para una selección posterior.

Nota: La etiqueta de las placas donde se recuperaron los ovocitos para la primera clasificación que se muestran en la Tabla N° 2, responden a las siguientes categorías: Placa A (Categoría I) Placa B (Categoría II), Placa C (Categoría III) y Placa D (ovocitos indeterminados).

3.4.4.2. Segunda clasificación:

Para esta segunda clasificación, se trabajó solamente con las placas A y B cada una por separado y en ese orden respectivamente. Se visualizó en su conjunto todos los ovocitos clasificados y se seleccionaron solamente aquellos que cumplieron con las características establecidas en la tabla N° 2.

Para finalizar se realizaron tres lavados en gotas de 100 µl de medio de lavado dispuestas en una placa Petri grande, y un lavado en medio de maduración colocado en una placa Petri pequeña.

La selección se realizó empleando micropipetas de 10 y 100 μ l. La placa con gotas de medio de lavado, así como la placa con medio de maduración permanecieron en la incubadora a 38.5°C, 5% CO₂, 95% aire y alta humedad hasta el momento de su uso.

Tabla N° 3. Parámetros de la segunda clasificación

Categoría	Características
I	<ul style="list-style-type: none"> - Ovoplasma homogéneo pignótica y morfológicamente. - Más de 4 capas de células del cúmulus. - Cubierto total y homogéneamente por las células del cúmulus.
II	<ul style="list-style-type: none"> - Ovoplasma homogéneo pignótica y morfológicamente. - De 2 a 4 capas de células del cúmulus. - Cubierto total o parcialmente por las células del cúmulus.

Nota: Los ovocitos que durante proceso de lavado llegaron a desnudarse completamente o perdieron la homogeneidad del ovoplasma por causa de su manipulación, fueron descartados para la MIV.

3.4.5. Maduración *in vitro*

Los ovocitos seleccionados para la MIV, se colocaron en la placa de pocillos con 500 μ l de medio de maduración por pocillo, en un número no mayor de 25 ni menor de 5 ovocitos por pocillo. El pocillo fue tapado y colocado en la incubadora a una temperatura de 38.5 °C, una humedad del 100 %, y una atmósfera gaseosa de 95% de aire y 5 % de CO₂.

3.4.6. Evaluación del tiempo de maduración *in vitro*

Para determinar el tiempo óptimo de maduración *in vitro* de los ovocitos, se les evaluó a las 24, 32, y 34 horas de incubación. En estos tiempos se evaluó las características morfológicas que nos pueden indicar que el ovocito alcanzó su maduración.

Estas características fueron la homogeneidad tanto morfológica como pignótica del ovoplasma, y la expansión de las células del cúmulus de cada ovocito.¹⁶

3.4.7. Suplementación nutricional de las alpacas machos

Como el trabajo se desarrolló en época no reproductiva, se suplementó a todos los machos con pacas de alfalfa en la tarde, al momento que regresaban del pastoreo; y se les suministró vía intramuscular 2 ml de Vigantol ADE y 5 ml de Fosfovite como complementos vitamínicos. Figura N° 27.

3.4.8. Colección de semen

La recolección de semen se realizó por dos metodologías, las cuales se describen a continuación.

3.4.8.1. Colección por vagina artificial (VA)

La colección por vagina artificial, se realizó solamente con las alpacas machos que presentaban interés por la monta en maniquí.

Primero se realizó el armado de la vagina artificial según la metodología del CIP Quimsachata, y se manejó un rango de temperatura interna en la vagina de 35 a 38 °C; con una presión interna modulada manualmente para cada alpaca.

Se usó un maniquí para cada alpaca de acuerdo a las características que le resultasen más cómodas a cada macho para la monta.

Para un control adecuado de los donadores de semen se registró el número de arete, así como las características organolépticas, volumen obtenido, concentración espermática, motilidad y otras características registradas en el patrón de colección.

3.4.8.2. Colección por electroeyaculación (EE)

La colección por electroeyaculación, se realizó a ciertos machos que inicialmente presentaron un escaso o nulo interés por el maniquí.

Para tranquilizar al animal, se le colocó vía endovenosa 1 ml de ketamina y 0.5 ml de xilacina empleando una jeringa de 2 ml con aguja 21 G. Con el animal tranquilizado, se le hecho cuidadosamente en el piso; se le desvainó el pene y se le colocó el transductor del electroeyaculador vía rectal, orientándolo a la próstata. De la misma

manera, se realizó un registro del número de arete, y las otras características seminales mencionadas en la técnica anterior.

3.4.9. Selección del método de colección de semen

Para determinar el método de colección de semen que nos brinde mayores características seminales y espermáticas favorables, se comparó los registros de los métodos de colección, así como las características seminales y espermáticas (motilidad y concentración).

3.4.10. Estandarización de la técnica de gradiente de densidad

La estandarización de la técnica de gradiente de densidad se realizó empleando Percoll ®, para las características seminales de los machos donadores, así como las condiciones ambientales propias de la altura.

3.4.10.1. Evaluación de las gradientes

Se preparó dos gradientes de Percoll al 90% y al 45% para una prueba, y otras dos gradientes de Percoll de 45% y 22.5% para la segunda prueba. Para la preparación de las gradientes se colocó 1 ml de cada Percoll en un tubo falcon de 15ml, siempre el de mayor densidad al comienzo y el de menor densidad después. Se colocó cuidadosamente 0.5 ml del eyaculado en cada tubo sobre la gradiente preparada, evitando que la gradiente se mezcle.

Los tubos fueron centrifugados a 3500 RPM por 10 minutos. Finalmente se evaluó la formación de un pellet en la base o paredes del tubo conteniendo los espermatozoides.

3.4.10.2. Evaluación de las RPM

Se preparó las gradientes con las mismas densidades empleando el procedimiento descrito anteriormente. Los tubos fueron centrifugados a 2500, 3500 y 6000 rpm, por 10 minutos las dos primeras y 5 minutos la última debido a la alta velocidad de centrifugación. Se evaluó la formación de un pellet en la base o paredes del tubo el cual debía contener los espermatozoides.

3.4.10.3. Evaluación del tiempo de centrifugación

Se preparó las gradientes empleando las mismas densidades con el procedimiento descrito. Los tubos fueron centrifugados a 3500 RPM por 5, 10 y 15 minutos. Igualmente se evaluó la formación de un pellet en la base o paredes del tubo conteniendo los espermatozoides.

3.4.11. Lavado de los espermatozoides

Para el lavado, se recuperó el pellet formado en la centrifugación con ayuda de una micropipeta, y se resuspendió en 100 μ l de medio SPERM-TALP en un tubo Eppendorf, para luego ser centrifugado a 3500 RPM por 5 minutos.

El nuevo pellet, se recuperó y se resuspendió nuevamente en 230 μ l de medio FERTIL-TALP para su mantenimiento hasta su uso en la fertilización

3.4.12. Capacitación espermática

En un tubo Eppendorf, se colocó 220 μ l de la solución con espermatozoides obtenida en el procedimiento anterior, 30 μ l de solución de Heparina y 30 μ l de solución PHE (Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina).

Se homogenizó la solución empleando una micropipeta y se sacó una pequeña alícuota para evaluar el progreso de los espermatozoides en su motilidad, así como su concentración. Finalmente el tubo se colocó en baño maría a 37 °C hasta su uso.

3.4.13. Fertilización *in vitro*

Para la fertilización *in vitro* se colocó en cada pocillo de una placa 250 μ l de medio FERTIL-TALP y se rotuló para su identificación.

Los ovocitos que presentaron las características mencionadas en la tabla N° 12 para ser considerados como madurado; se seleccionaron con una micropipeta y se les realizó tres lavados en gotas de 50 μ l de medio FERTIL – TALP, antes de colocarlos en los pocillos de la placa de fertilización. Los ovocitos fueron colocados en las placas con una hora de anticipación a ser fertilizados.

Transcurrido el tiempo de adaptación de los ovocitos a fertilizar, se colocó 250 μ l de la solución espermática previamente capacitada en cada pocillo y se tomó la hora de fertilización.

La placa con el co-cultivo de ovocitos y espermatozoides se dejó por un tiempo de 18 a 20 horas en la incubadora a 38.5°C, una humedad del 100 %, y una atmósfera gaseosa de 95% de aire y 5 % de CO₂.

Tabla N° 4. Parámetros de selección de ovocitos maduros

Características
<ul style="list-style-type: none"> - Ovoplasma homogéneo pínótica y morfológicamente. - Células del cúmulus expandidas y disgregadas - Aspecto mucoso entre las células del cúmulus de los ovocitos maduros.

3.4.14. Evaluación de la concentración espermática en la fertilización

Para determinar la concentración espermática óptima, se evaluó el desarrollo embrionario de ovocitos fertilizados con concentraciones menores y mayores a 1 x10⁶ espermatozoides/ml.

3.4.15. Cultivo *in vitro* de embriones

Los medios de cultivo embrionario fueron preparados y puestos en estabilización en la incubadora de CO₂ con anterioridad (KSOMaa, 12 horas y SOFaa, 2 horas)

3.4.15.1. Cultivo en medio KSOMaa

Los presuntos cigotos fueron desnudados de sus células del cúmulus empleando una micropipeta, y aquellos que presentaron un ovoplasma completamente regular sin ningún tipo de alteraciones, fueron seleccionados y lavados tres veces en medio KSOMaa antes de colocarlos en las placas de cultivo.

Los cigotos seleccionados fueron colocados en diferentes pocillos con 400 μ l de medio KSOMaa, respetando el rótulo de procedencia. La placa fue colocada en incubadora a 38.5°C, una humedad del 100 %, y una atmósfera gaseosa de 95% de aire y 5 % de CO₂.

Finalmente se tomó la hora de inicio de incubación, ya que el periodo de cultivo en este medio fue de 48 horas.

3.5.15.2. Cultivo en medio SOFaa

Los embriones que alcanzaron un desarrollo embrionario adecuado y no presentaron alteraciones a nivel de los blastómeros, fueron seleccionados y aspirados cuidadosamente para cambiarlos al segundo medio de cultivo.

Los embriones fueron lavados tres veces en medio SOFaa y finalmente se colocaron en los pocillos de la placa de cultivo que contenían 500 µl de medio SOFaa, de la misma manera respetando el rótulo de procedencia.

La placa fue colocada en incubadora a 38.5°C, una humedad del 100 %, y una atmósfera gaseosa de 95% de aire y 5 % de CO₂. Finalmente se tomó la hora de inicio de la incubación, y se dejó en cultivo hasta el 7° día donde se realizó la evaluación final.

3.5.16. Evaluación del desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario fue evaluado a las 24 y 48 horas, así como al día 6 y 7 de cultivo embrionario. Para la evaluación adecuada de los blastómeros, se evaluó empleando un microscopio con cámara, que permitió la visualización en pantalla de los embriones.

La evaluación fue realizada siempre empleando una platina térmica, y en el menor tiempo posible para no exponer en sobremanera a los embriones a condiciones no adecuadas.

3.6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las formulas empleadas para encontrar los diferentes porcentajes fueron las siguientes:

- a) Promedio de recuperación de ovocitos

$$X = \frac{A + B + C}{\text{número total de ovarios}}$$

Donde:

A = Número total de ovocitos de categoría I

B = Número total de ovocitos de categoría II

C = Número total de ovocitos de categoría III

b) Tasa de maduración *in vitro*

$$\% \text{ Maduración} = \frac{\text{Total ovocitos maduros}}{\text{Total ovocitos cultivados}} \times 100$$

c) Tasa de ovocitos fertilizados

$$\% \text{ Fertilización} = \frac{\text{Total cigotos}}{\text{Total ovocitos fertilizados}} \times 100$$

d) Tasa de Mórulas

$$\% \text{ Mórulas} = \frac{\text{Total mórulas}}{\text{Total cigotos cultivados}} \times 100$$

e) Tasa de Blastocistos

$$\% \text{ Blastocistos} = \frac{\text{Total blastocistos}}{\text{Total cigotos cultivados}} \times 100$$

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1.1. Recolección y transporte de los ovarios

Las muestras fueron recolectadas de los Centro de Beneficio Familiar (CBF) de Santa Lucía y del Camal Municipal (CM) Nuñoa durante toda la faena de matanza en los días programados y transportados al laboratorio del CIP Quimsachata haciendo uso del transporte público. El uso de este tipo de transporte se ve manifestado claramente en el promedio de tiempo de transporte de ambos centros, siendo el más cercano el C.B.F de Santa Lucía.

Tabla N° 5. Temperatura y tiempo de transporte de las muestras.

Centro de Recolección	\bar{X} Temperatura llegada °C	\bar{X} tiempo transporte hh:mm
C.M. Nuñoa	35.94 ± 1.03	$05:30 \pm 00:31$
C.B.F. Sta. Lucía	$34.60 \pm 4,39$	$00:54 \pm 00:34$

Ambos centros son las fuentes más cercanas al CIP Quimsachata, por lo que se consideró necesario evaluar el tiempo de transporte que toma en llegar las muestras y la temperatura a la que llegaron.

Anteriores trabajos como los realizados por Arriaga *et al*²⁷ y Huanca *et al*²⁸ determinaron que la temperatura de transporte de los ovarios es importante para obtener una buena calidad de ovocitos, ya que mientras más alta era la temperatura de transporte mejor era la calidad de los ovocitos recuperados. Es por este motivo que en el presente trabajo se manejó la temperatura lo más cercano a los valores fisiológicos normales (35 – 37°C).

4.1.2. Evaluación de la tasa de recuperación por slicing y aspiración folicular

Un aspecto importante fue determinar el método de recuperación para las corridas que se realizarían en adelante. La prueba fue realizada con ovarios transportados bajo las mismas condiciones desde el C.M. de Nuñoa para su procesamiento.

Tabla N° 6. Promedio de recuperación de ovocitos por Slicing y Aspiración.

Técnica de Recuperación	N° Ovarios Trabajados	Categoría de Ovocitos			Ovocitos Recuperados	X Recuperación ovocitos/ovario
		I	II	III		
Slicing	19	14	22	14	50	2.6316
Aspiración	24	6	17	3	26	1.0833

La técnica de aspiración debido a su baja complejidad permite realizar la recuperación de los ovocitos en corto tiempo, es decir la aspiración permite avanzar con más rapidez en la recuperación del fluido folicular que contiene los ovocitos. En contraste la técnica de recuperación de slicing que es más trabajosa, toma más tiempo en la recuperación de los ovocitos, sin embargo, hay una mayor seguridad en la recuperación debido a la visualización del ovocito al momento del corte del folículo.

En consecuencia, como se puede observar en la tabla N° 6, la tasa de recuperación de ovocitos por ovario es mayor en la técnica de slicing (2.63 ovocitos/ovario), permitiendo disponer de una mayor cantidad de ovocitos para su clasificación.

Tabla N° 7. Calidad de ovocitos recuperados por Slicing y Aspiración.

Técnica de Recuperación	# Ovarios Trabajados	Categoría de Ovocitos			Ovocitos Recuperados
		% I	% II	% III	
Slicing	19	28	44	28	50
Aspiración	24	23.08	65.38	11.54	26

En lo que corresponde a la calidad de los ovocitos recuperados, la técnica de aspiración fue superior con un 88.46% de ovocitos de categoría I y II, frente a un 72 % del slicing. Los resultados obtenidos concuerdan los presentados por Hernández *et al* ²⁹

que indican que la técnica de slicing presenta una mayor recuperación de ovocitos, sin embargo por aspiración la calidad de estos últimos es mejor. En los trabajos de maduración o fertilización *in vitro* en camélidos ambas técnicas son empleadas, tanto la de aspiración^{30,31} o slicing.^{32,33} Esto dependerá principalmente de la destreza del operador, ya que este es un factor determinante en la recuperación. Otros autores también prefieren la recuperación de ovocitos por aspiración intravaginal empleando ecógrafo (OPU) en la cual la calidad de los ovocitos es mayor y garantiza un mayor desarrollo embrionario.³¹

Finalmente la técnica de Slicing fue la técnica seleccionada para el procesamiento de los ovarios en las pruebas siguientes, debido principalmente a la tasa de recuperación mayor y la certeza en la recuperación al ser visualizado el ovocito al momento de su liberación.

4.1.3. Evaluación de la recuperación de ovocitos en ovarios con CL y ovarios sin CL

Para priorizar el trabajo entre todos los ovarios recolectados (con y sin CL) se realizó la evaluación de la recuperación de ovocitos a partir de ovarios con cuerpo lúteo y sin cuerpo lúteo; para determinar de cuales se obtiene una mayor cantidad así como calidad de ovocitos y de esa manera priorizar la recuperación en estos, ya que la presencia de un CL influye hormonalmente sobre los folículos de ese ovario.

Tabla N° 8. Tasa de recuperación en ovarios con CL y sin CL.

Clasificación	N° Ovarios	Ovocitos Recuperados	\bar{X} Recuperación ovocitos/ovario
Ovarios sin C.L.	55	461	8.25 ± 2.97
Ovarios con C.L.	42	233	5.63 ± 1.36

La tasa de recuperación promedio en los ovarios sin CL es mayor que en los ovarios con CL con 8.25 ± 2.97 y 5.63 ± 1.36 ovocitos/ovario respectivamente lo cual nos indicaría en los primeros se tendría que priorizar el trabajo. Ahora bien, la evaluación de la calidad de estos ovocitos inclusive es más determinante por lo cual también tuvo que evaluarse.

Tabla N° 9. Calidad de ovocitos recuperados de ovarios con CL y sin CL.

Fuente	Categoría			Total Ovarios
	I %	II %	III %	
Ovario sin C.L.	26.37 ± 12.42	10.66 ± 2.32	62.97 ± 12.64	55
Ovario con C.L.	17.75 ± 10.47	18.12 ± 13.41	64.13 ± 10.05	42

De la tabla N° 9, se determinó que solamente en las categorías I y II se obtuvo 37.03% y 35.87% para los ovarios sin CL y con CL respectivamente. Finalmente en esta evaluación de acuerdo al estado fisiológico de los ovarios se puede concluir que de aquellos que no presentan CL se puede recuperar una mayor cantidad de ovocitos, siendo su calidad mayor en comparación con la recuperación de los ovarios con CL, determinando que los ovarios sin CL sean priorizados en las futuras recolecciones de ovocitos.

La calidad como cantidad de ovocitos recuperados, es consecuencia del estado fisiológico del ovario. La marcada alternancia funcional que presenta la alpaca ocasiona que el cuerpo lúteo ejerza la dominancia y el manejo hormonal dentro del ovario; manteniendo la regresión en el resto de folículos.^{7,9}

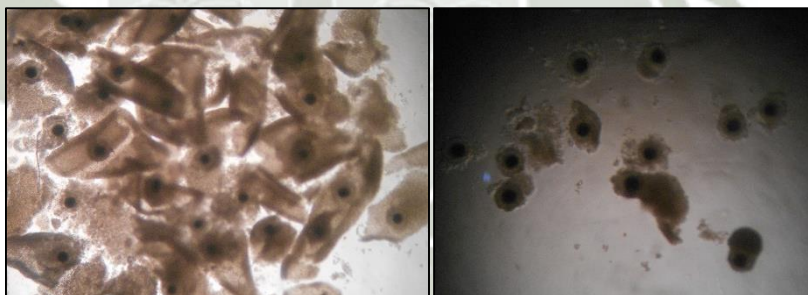


Figura N° 2. Ovocitos recuperados de categoría I y II respectivamente.

4.1.4. Maduración *in vitro*

4.1.4.1. Evaluación del tiempo de maduración a las 24, 32 y 34 horas

En la presente investigación, debido a que se busca la adaptación de un protocolo de bovinos, se emplearon las mismas hormonas en las mismas cantidades. Considerándose

necesaria una evaluación del tiempo de maduración de acuerdo a las condiciones experimentales en la estación.

Tabla N° 10. Evaluación de tiempos para MIV de ovocitos de alpaca.

Pocillo	Recuperación Ovocitos		MIV - 24 h	MIV - 32	MIV - 34
	Clasificación	N° Ovocitos	Madurados	Madurados	Madurados
1	I	10	-	+	++
	II				
2	I	17	-	+	++
	II				

Los tiempos establecidos nos permitirían corroborar trabajos anteriores realizados en alpacas, con el fin de establecer cuál es el tiempo más adecuado para implementar un protocolo acorde a las condiciones experimentales de la estación. La escala cualitativa se basó únicamente en las características morfológicas reportadas por Ratto *et al*^{34, 35} y confirmadas nuevamente en el 2007 en ovocitos madurados *in vivo*; que indican un aspecto oscuro y homogéneo invariable en el ovoplasma, así como la expansión de las CCs que nos indica una maduración del ovocito.

Los resultados obtenidos nos indican que en los tiempos evaluados de 24, 32 y 34 horas, la última es la que presentó un mayor índice de maduración de los ovocitos de categorías I y II. También nos muestra que a las 24 horas el índice de maduración *in vitro* es nulo.

Estos resultados si bien son cualitativos, coinciden con los obtenidos por Huanca *et al*^{30, 36}. También son corroborados por Ratto *et al* (2005) en llamas, los cuales indican que se requiere necesariamente tiempos de maduración superiores a las 38 horas para alpacas y 28 horas para llamas respectivamente. Conforme más tiempo se le brinde a los ovocitos en condiciones *in vitro*, la tasa de maduración aumenta.

Un aspecto importante a considerar son las concentraciones de las hormonas y la diversa conjugación hormonal en trabajos realizados en alpacas^{17, 19, 27, 30, 36, 37} en llamas^{32, 34, 39} y dromedarios³⁸ que nos indican que el uso de estas hormonas es necesario para estimular el reinicio de la maduración. Sin embargo la adecuada combinación de FSH con

LH demostrada por Salgado *et al*⁴⁰ pone en evidencia que puede incrementar la tasa de maduración y el futuro embrionario bajo una adición superior de LH en la MIV. Como resultado de esta evaluación se determinó emplear 34 horas de maduración *in vitro* para los ovocitos recuperados con el fin de que un mayor número alcance su maduración.

4.1.5. Colección de semen

4.1.5.1. Evaluación las características de semen colectado por VA

Tabla N° 11. Características del semen colectado por VA

N° Colecciones	Color	Olor	Volumen ml	Concentración x10 ⁶ esp/ml	Motilidad %
7	Blanco lechoso a semi lechoso	Sui generis	0.96 ± 0.40	13.44 ± 9.58	66.43 ± 8.02

Las características organolépticas obtenidas de la colección por VA se encuentran dentro de las normales fijadas por la literatura.^{7, 9} En el volumen se puede considerar dentro del rango de valores recopilados por diversos autores.^{41, 42} En cuanto a la dificultad de colección, inicialmente fue moderadamente alta debido a la época en la cual se realizó el trabajo, para lo cual se tuvo que progresivamente entrenar al grupo de machos seleccionados.

4.1.5.2. Evaluación las características de semen colectado por EE

Tabla N° 12. Características del semen colectado por EE

N° Colecciones	Color	Olor	Volumen ml	Concentración x10 ⁶ esp/ml	Motilidad %
5	B. lechoso - B. semi lechoso	Sui generis	3 ± 2.16	5.45 ± 1.77	47 ± 17.5

Las características del semen colectado por EE no difieren mucho de las características fijadas por la literatura. Sin embargo en el promedio de volumen obtenido,

la desviación estándar es mayor lo que indica una variación considerable entre los datos recolectados.

La dificultad de colección principalmente se encontró en el procedimiento, ya que necesariamente se tuvo que colocar los anestésicos, y una vez que el animal se encontraba tranquilizado, proceder a descubrir el pene el cual debido a su anatomía requería de práctica.

La comparación de ambos cuadros nos indica que en cuanto a color no presenta variación alguna. Sin embargo, en el volumen colectado se puede observar que por EE se obtuvo una mayor cantidad (3 ± 2.16 ml) frente a la colección por VA (1.03 ± 0.54 ml). Aunque la desviación estándar es menor en la colección por VA lo cual nos indicaría que el promedio tiene una menor variación. Otro aspecto relevante en ambas muestras es la alta viscosidad presentada típica del eyaculado de los camélidos.⁴²⁻⁴⁴

Las otras dos características evaluadas, tanto concentración espermática como motilidad; nos indicarían que la técnica que nos brinda mejores resultados es la colección por VA.

4.1.5.3. Evaluación de las alpacas machos para colección

Tabla N° 13. Colecciones de semen realizadas por VA

N° Colección	Volumen ml	Concentración $\times 10^6$ esp/ml	Motilidad %
1	1.5	5.2	65
2	1	23.4	70
3	1	9.4	70
4	0.25	0.4	50
5	1	22.9	75
6	espuma	23.1	65
7	1	9.7	70
Promedio	0.96 ± 0.40	13.44 ± 9.58	66.43 ± 8.02

El grupo de colección, fue un grupo de alpacas machos donadores seleccionado, dentro de los cuales se contaba con aquellos que presentaron un mayor interés por el maniquí. El promedio de volumen obtenido por el grupo fue de 0.96 ± 0.40 ml, una

concentración espermática de $13.44 \pm 9.58 \times 10^6$ esp/ml, y en cuanto a la motilidad un promedio de 66.43 ± 8.02 %. En cuanto al volumen esto se puede deber a que las alpacas tienden a eyacular varias veces durante la copula ⁴¹, por lo cual el volumen de eyaculado varía ligeramente entre macho a macho.

Esta característica se podría mejorar modificando la estructura de la VA ⁴⁵ lo cual prolongaría el tiempo de cópula y aumentaría el volumen, permitiendo mantener una proporción de plasma lo cual se ha demostrado que permite preservar la integridad del acrosoma y mantener la viabilidad espermática.⁴⁶ Las desviaciones estándar son altos debido a la variación de los valores registrados, los mismos que se pueden deber tanto a factores ambientales propios de la época, como técnicos. Esto se puede deber a la frecuencia de colecciones, las mismas que se verán reflejadas en la morfología y la concentración⁴⁷ las mismas que se verán reflejadas también en la fertilización. Otro aspecto importante que se ha demostrado, es la influencia del medio ambiente, ya que está demostrado que en época de lluvia se logra obtener mejores muestras. ⁴⁴

La época en la que se realizó el presente trabajo fue en época seca, como se explicó anteriormente caracterizada por la presencia abundante de sol, bajas temperaturas en la sombra, ausencia de lluvias y escases de pastos naturales.

4.1.6. Estandarización de la técnica de gradiente de densidad

En diferentes trabajos de investigación de fertilización *in vitro* donde se emplea semen, las técnicas de selección espermática como la gradiente de densidad son estandarizadas para las características propias de cada investigación. En este trabajo se estandarizó la gradiente de densidad empleando Percoll ® para las muestras por VA y para las condiciones propias de la estación.

4.1.6.1. Evaluación de la gradiente

La eficacia de la gradiente de densidad muchas veces está sujeta al tipo diluciones que se utilizan pudiendo ser de 90 y 45% o de 45 y 22.5% de Percoll ® diluido en medio FERTIL-STOCK y regulado el pH a 7.4

Tabla N° 14. Evaluación de la gradiente de densidad

Densidad de Gradiente	Resultado
90/45	<ul style="list-style-type: none"> - La gradiente no permitió la separación de los espermatozoides. - El plasma seminal se encontró íntegro y sin separación alguna.
45/22.5	<ul style="list-style-type: none"> - Se formó un pellet en la base del tubo falcon. - La ubicación del pellet dependió de las RPM durante la centrifugación.

Como resultado de la evaluación, se determinó que la gradiente que permitió la selección espermática y la consecuente formación del pellet que contenía los espermatozoides fue la de 45/22.5%. La gradiente de 90/45% al término de la centrifugación no presentó ninguna alteración en la muestra de semen, la misma que se mantuvo como un anillo en la parte superior del tubo.

En trabajos realizados de FIV se ha podido constatar que la procedencia de la muestra seminal tiene una gran importancia debido a la cantidad de plasma que pueda poseer, resultando en algunos casos efectiva el uso de la gradiente de 90/45% para el semen colectado de epidídimo.^{32, 33, 37}

Aunque para esta fuente seminal también resultó efectiva la gradiente de 45/22.5%^{27, 30, 36} quedando demostrado que siempre es necesaria una estandarización de la técnica de selección espermática. La gradiente establecida en la presente evaluación coincide con la técnica empleada por Khatir *et al*³⁸ que empleó la gradiente de 45/22.5% para seleccionar espermatozoides de una muestra de semen fresco de dromedario.

4.1.6.2. Evaluación de las RPM

Tabla N° 15. Evaluación de las RPM

RPM	Resultado
2500	<ul style="list-style-type: none"> - No formó pellet. - La muestra seminal no presentó separación.
3500	<ul style="list-style-type: none"> - Formó pellet en la base y pared lateral del tubo. - Espermatozoides vivos.
6000	<ul style="list-style-type: none"> - Formó pellet en la base y pared lateral del tubo. - Espermatozoides muertos.

La evaluación de las diferentes rpm permitió determinar que revoluciones muy bajas (2500) no permite romper el grado de viscosidad del semen y por consecuencia no puede realizar efectivamente la selección. La evaluación a 6000 rpm dio como resultado la baja especificidad de la técnica, ya que debido a la excesiva aceleración no permitió una selección adecuada, descendiendo todos los espermatozoides.

Las revoluciones altas pueden generar un estrés sobre los espermatozoides, la misma que puede tener efectos sobre la integridad del acrosoma y de la misma viabilidad del espermatozoide. La rpm adecuada para las condiciones de trabajo en el presente protocolo es de 3500 la cual permite una correcta selección y formación del pellet en la base del tubo.

4.1.6.3. Evaluación del tiempo de centrifugación

La evaluación del tiempo de centrifugación permitió determinar que el tiempo indicado para la centrifugación de los espermatozoides fue de 10 minutos, la cual presentó formación de pellet en la base con espermatozoides vivos.

Tabla N° 16. Evaluación del tiempo de centrifugación

Tiempo	Resultado
5 minutos	- No se formó el pellet en la base del tubo. - La muestra seminal, presentó una ligera separación.
10 minutos	- Se formó pellet en la base y pared lateral del tubo. - Espermatozoides vivos.
30 minutos	- Se formó pellet en la base y pared lateral del tubo. - Los espermatozoides recuperados se encontraban muertos.

La centrifugación por un tiempo prolongado (30 minutos) permite una formación de pellet pero los espermatozoides recuperados se encuentran muertos, y la centrifugación por 5 minutos no tiene ningún efecto sobre la muestra.

Si bien como se explicó anteriormente no hay un tiempo definido de aplicación general para la centrifugación, sin embargo según referencias bibliográficas podemos determinar que este puede ser variable dentro de los 10 a 25 minutos.^{27, 30, 32, 38} El tiempo

de centrifugación, estará sujeto a la procedencia y evaluación preliminar de viscosidad que se realice en esta, siendo este el motivo por el cual debe ser previamente evaluado.

Como resultado de la estandarización de la técnica de gradiente de densidad, se determinó que esté conformada para el presente trabajo por 45/22.5% de Percoll®, con una centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos.

4.1.7. Fertilización *in vitro*

Se evaluó la tasa de fertilización *in vitro*, mediante un co-cultivo de ovocitos maduros con concentraciones variable de espermatozoides, las cuales se agruparon en dos grupos uno fertilizado con más de 1×10^6 esp/ml y otro con menos de 1×10^6 esp/ml.

Esto nos permitió determinar el rango de concentraciones fertilizantes que presentan los mejores resultados, para poder aplicar posteriormente al presente protocolo.

4.1.7.1. Evaluación de la concentración espermática en el desarrollo embrionario

Tabla N° 17. Concentración espermática y porcentaje de fertilización

Grupo	N° Corrida	Concentración $\times 10^6$ esp/ml	Fertilización %	Fertilización Promedio %
< 1×10^6 esp/ml	4	0.5	38.64	22.56 ± 14
	7	0.9	17.50	
	9	0.1	11.54	
> 1×10^6 esp/ml	10	2.4	0.00	12.57 ± 11
	19	3.7	21.05	
	20	1.4	16.67	

En la tabla N° 17 se muestra la tasa de fertilización *in vitro*, donde se consideró todos los cigotos obtenidos en cada corrida como consecuencia de la concentración fertilizante. La tasa de fertilización promedio es menor para los ovocitos fertilizados con concentraciones superiores a 1×10^6 esp/ml ($12.57 \pm 11\%$) frente a la tasa obtenida en ovocitos fertilizados con concentraciones menores ($22.56 \pm 14\%$).

Si bien no hay una concentración exacta que se pueda aplicar homogéneamente a las diferentes fertilizaciones debido a la variabilidad de resultados, podemos establecer un rango de concentración en los cuales se han obtenido mejores tasas de clivaje o fertilización. En diversos trabajos de investigación realizados se ha alcanzado tasas de fertilización o clivaje relativamente variables con concentraciones menores; correspondientes a valores como 0.1×10^6 esp/ml con 27.1% de tasa de clivaje.³⁷ Esto también se manifiesta con concentraciones altas para valores como de 4×10^6 esp/ml (36%)³⁹ y $2-3 \times 10^6$ esp/ml (29%)³³.

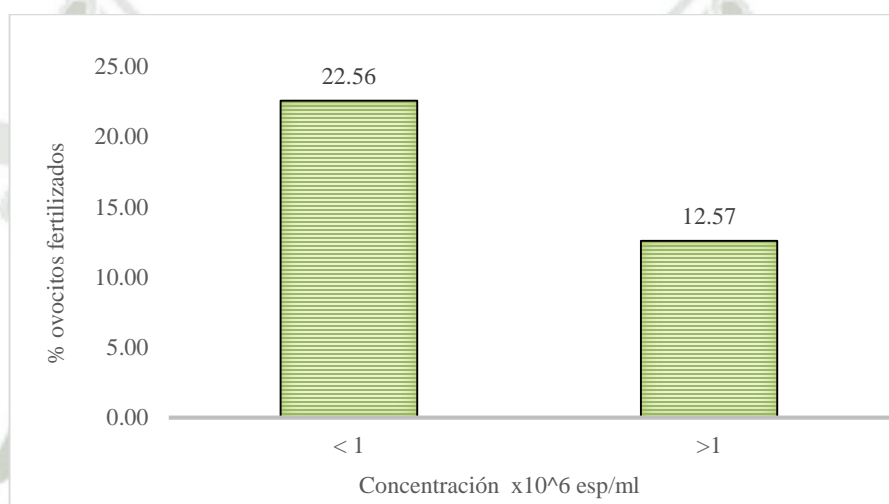


Figura N° 3. Concentración y tasa de fertilización

Las tasa de clivaje con resultados más altos se consiguieron con concentraciones fertilizantes de 1×10^6 esp/ml³² y 0.5×10^6 esp/ml³⁸ con tasa de clivaje de 65% y 64%, en llamas y dromedarios respectivamente.

Sin embargo el margen de diferencia es aceptable debido a que las condiciones de fertilización y de trabajo en cada una de las investigaciones son variables considerables que se verán manifestadas en la tasa de desarrollo embrionario.

4.2. EVALUACIÓN GENERAL DEL PROTOCOLO DE FIV A 4200 MSNM

4.2.1. Tasa de recuperación de ovocitos

Tabla N° 18. Tasa de recuperación de ovocitos

N° Corrida	Ovarios	Ovocitos por Categoría			Total	Tasa Recuperación ovocitos/ovario
		I	II	III		
4	37	34	56	147	237	6.41
5	21	28	19	64	111	5.29
6	27	32	24	159	215	7.96
7	17	34	23	191	248	14.59
8	7	2	6	62	70	10.00
9	13	26	17	62	105	10.38
10	12	17	4	62	83	6.92
11	24	26	22	117	165	6.88
12	18	26	21	79	126	7.00
13	12	31	31	47	109	9.08
14	22	27	26	127	180	8.18
15	6	12	12	2	26	4.33
16	6	18	14	22	54	9.00
17	22	23	24	62	109	4.95
18	17	17	25	62	104	6.12
19	21	28	12	36	76	3.62
20	15	29	5	42	76	5.07
Promedio						7.40 ± 2.70

La tasa de recuperación obtenida del presente protocolo realizada a un total de 297 ovarios, de los cuales se recuperó 2094 ovocitos entre las categorías I, II y III fue de 7.40 ± 2.70 ovocitos por ovario, empleando la técnica de recuperación de slicing modificado. Como se puede observar en la figura N° 4, el valor más alto obtenido en la tasa de recuperación fue de 14.59 y el menor de 3.62 ovocitos/ovario.

La variación en la tasa de recuperación de ovocitos se puede deber a diferentes factores implicados anteriormente expuestos en los resultados obtenidos de la evaluación entre técnicas de recuperación. El primer factor que puede afectar en la recuperación de los ovocitos a partir de ovarios de matadero, es la situación fisiológica de estos, ya que la mayoría de alpacas sacrificadas

presentaron niveles avanzados de preñez, lo cual hormonalmente se manifiesta en la dominancia del CL sobre el desarrollo de folículos ováricos y por ende en la tasa de recuperación.

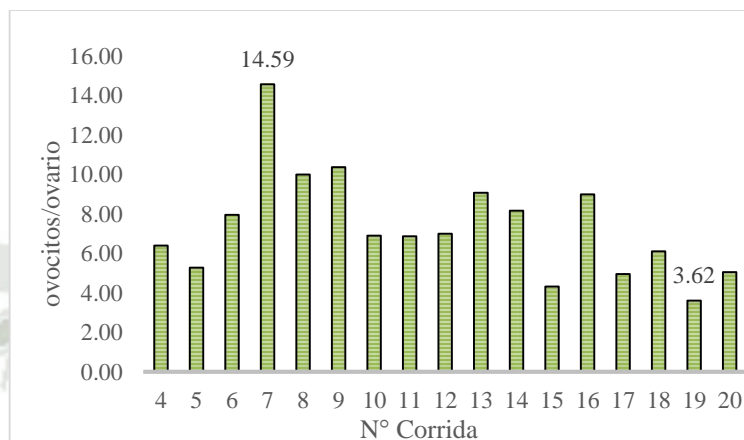


Figura N° 4. Tasa de recuperación de ovocitos.

Otro aspecto importante que afecta la tasa de recuperación en cuanto a la calidad de ovocitos recuperados, son las condiciones de transporte desde los centros de beneficio familiar (CBF) de Santa Lucía y del camal municipal de Nuñoa. Definitivamente las condiciones de transporte influyen en la calidad de los ovocitos recuperados, sobre todo la temperatura.^{27, 28}

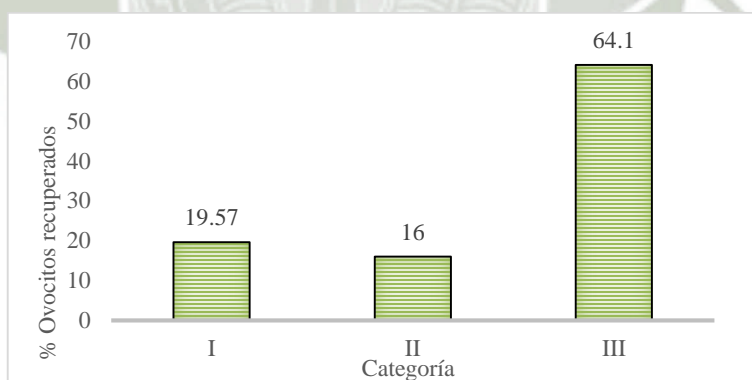


Figura N° 5. Porcentaje de ovocitos recuperados por categoría

Como se puede observar en la figura N° 5, de los ovocitos recuperados se alcanzó un mayor porcentaje en la categoría III (64.1%), y una menor cantidad en la categoría I (19.57%) y II (16%). Esta es una característica propia de la técnica de slicing reportada

por Hernández et al.^{29, 31} El éxito de la recuperación dependerá claramente de la habilidad y práctica del operador, ya que la recuperación empleando slicing es una importante técnica para recuperación de ovocitos en comparación con la aspiración.³¹

El valor obtenido es menor al reportado por Gamarra *et al*³⁷ quienes reportaron una tasa de recuperación de 8.5 COCs/ovario de alpaca, frente al 7.40 del presente trabajo.

4.2.2. Tasa de maduración *in vitro*

Los resultados obtenidos en porcentaje bajo las condiciones de maduración establecidas en las evaluaciones preliminares fueron los siguientes que muestran en la tabla N° 19. Las condiciones de maduración fueron a 5% CO₂, por 34 horas, a una temperatura de 38.5°C con alta humedad.

Tabla N° 19. Tasa de maduración *in vitro*

N° Corrida	% Maduración
4	98.11
5	68.63
6	80.00
7	76.60
8	82.14
9	96.49
10	75.00
11	95.35
12	90.48
13	91.67
14	70.21
15	80.65
16	100.00
17	33.33
18	75.00
19	82.98
20	80.95
Promedio	81.18 ±14.86

La tasa promedio de maduración general presentada en la evaluación del protocolo es de 81.18 ±14.86 %, una tasa considerablemente alta debido a que los parámetros de

evaluación fueron netamente morfológicos. La desviación estándar alta, se puede deber a factores intrínsecos propios de los ovocitos en los cuales se ven manifestados diferentes factores propios del animal, como del proceso de laboratorio.

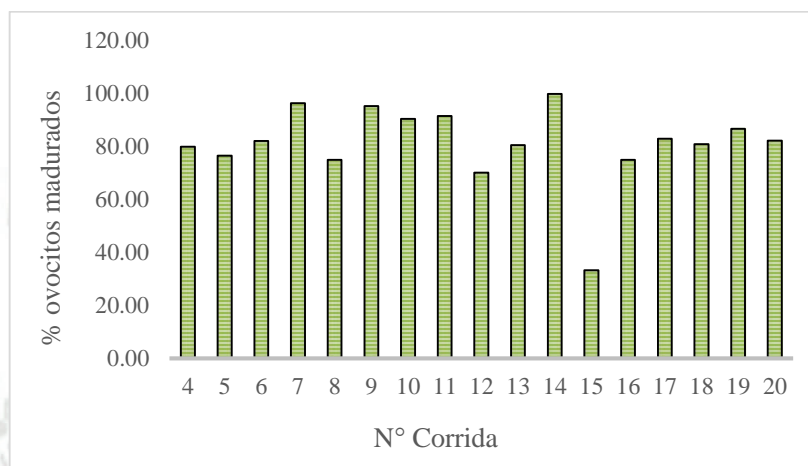


Figura N° 6. Porcentaje de maduración *in vitro* por cada corrida

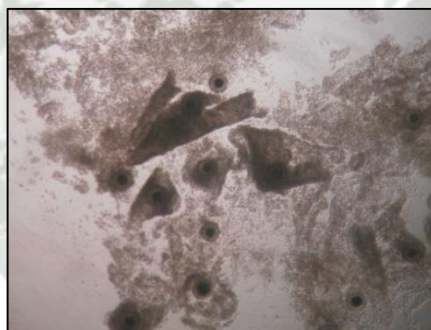


Figura N° 7. Ovocitos madurados *in vitro*

La tasa de maduración *in vitro* de los ovocitos se ve afectada por diferentes factores tanto fisiológicos, ambientales, como propios del ovocito.^{19, 48} Uno de estos factores es la diferente conformación del conjunto de hormonas empleadas, ya que en algunos protocolos se usa LH^{31, 34} como agente estimulante de la proliferación de las CCs, así otros homólogos que cumplen la misma función como la gonadotropina coriónica equina (eCG)^{31, 38} o gonadotropina coriónica humana (hCG).^{30, 36} Los ovocitos madurados *in vitro*, presentaron como característica la expansión de las células del

cúmulus y un aspecto mucoso fácil de identificar al momento de su manipulación con la micropipeta. En algunos ovocitos que disminuían las CCs se pudo visualizar el cuerpo polar en el espacio pre vitelino.

4.2.3. Tasa de la fertilización *in vitro*

La tasa de fertilización se tomó como a los cigotos obtenidos del total de ovocitos fertilizados. La fertilización se realizó empleando las técnicas establecidas y estandarizadas en las evaluaciones anteriores. La evaluación se realizó a las 18 horas del inicio del cultivo de los espermatozoides con los ovocitos madurados.

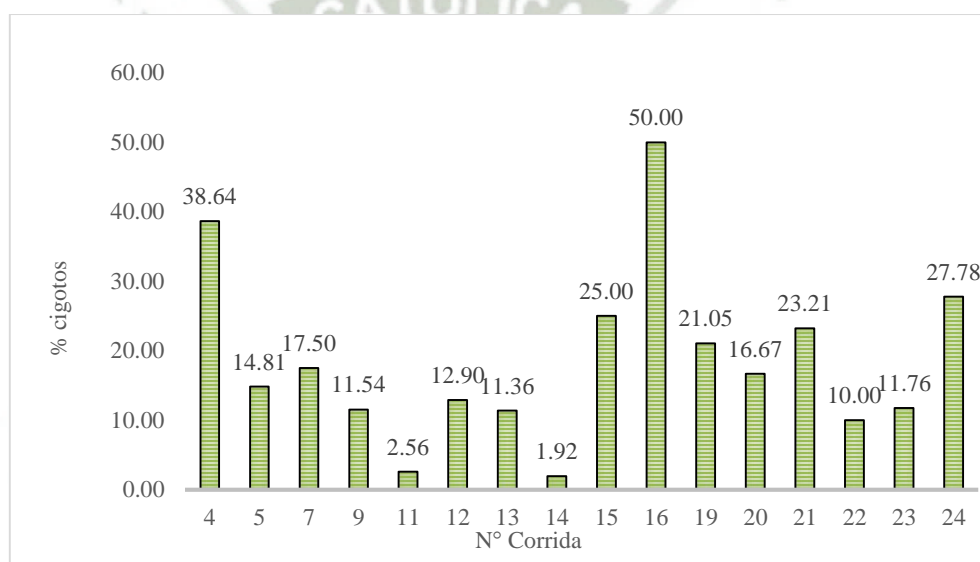


Figura N° 8. Porcentaje de fertilización *in vitro* por corrida

En la figura N° 8 se puede observar la gráfica correspondiente al porcentaje de cigotos obtenidos en cada corrida evaluada. Los porcentajes obtenidos en cada corrida son variables debido a la naturaleza de la investigación, la misma que fue afectada por diversos factores externos al proceso como son la calidad del semen obtenido de la colección realizada a los machos donadores.

Por otro lado, la estacionalidad reproductiva afecta las características seminales y está a su vez a la tasa de fertilización,⁴⁴ debido a que la selección espermática permite la eliminación parcial del plasma seminal pero la motilidad progresiva no es establecida

totalmente. Sin embargo los aditivos para la inducción de la hipermotilidad aumentan la vitalidad de los espermatozoides lo cual se pudo comprobar al final del tiempo de fertilización (18 horas).

La adecuada maduración citoplasmática alcanzada por los ovocitos durante la MIV, es vital para una exitosa fertilización ²⁰ y el posterior bloqueo para evitar el ingreso del espermatozoide en la ZP que generaría la polispermia. Las condiciones ambientales propias de la altura complican el manejo adecuado del proceso, obligando a este a realizarse con rapidez para evitar descensos en la temperatura del medio, así como el cambio en el pH de este durante el manejo fuera de cámara de estos. La Inyección Intracitoplasmática (ICSI) es una alternativa interesante que permitiría eliminar el factor limitante de la viscosidad en la muestra de semen, así como aumentar la probabilidad de una adecuada fertilización exitosa.¹⁹

En trabajos realizados en alpacas se ha probado el uso de enzimas disminuyan la viscosidad con la consecuente mejora en el movimiento de los espermatozoides en el eyaculado, sin embargo esta técnica debe ser probada previamente y evaluar la integridad del acrosoma, ya que puede ser dañado por las mismas enzimas.¹⁹

Durante el periodo de adaptación y modificación del protocolo inicial, se decidió realizar cambios en cuanto a la fertilización que se consideraron tendrían un efecto positivo. El primer cambio fue realizar un segundo lavado con medio de SPERM –TALP posterior a la selección espermática el mismo que no es considerado en el protocolo base. Esto permitiría eliminar los componentes como el Percoll ® que resultan tóxicos para los espermatozoides y se verán manifestados en la tasa de fertilización.

El segundo cambio fue en los medios tanto de base para la capacitación, como el medio de fertilización *in vitro*. El medio empleado para la capacitación y mantenimiento de los espermatozoides durante el periodo de transición hasta la fertilización fue el SPERM –TALP, y como medio base para la fertilización o co-cultivo de espermatozoides y ovocitos fue el FERTIL-TALP. Ambos medios fueron empleados por Khatir y Anouassi³⁸ en la FIV donde se obtuvo el primer dromedario *in vitro*, ya que estos medios poseen cantidades energéticas que satisfacen los requerimientos de los espermatozoides.⁴⁹

En este mismo protocolo se emplearon la hipotaurina, penicilamina, epinefrina y heparina para la capacitación espermática e inducción de la hipermotilidad.

La tabla de clivaje obtenida en este trabajo fue de 64% con una tasa de blastocisto de 46%, valores considerables en comparación con los obtenidos en el presente trabajo.

4.2.4. Evaluación del cultivo *in vitro* y desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario fue evaluado a los 7 días post cultivo en medio oviductal sintético (SOFaa). Los porcentajes, así como promedios fueron calculados en base al número total de cigotos obtenidos, considerando estos desde la división de 2 blastómeros hasta el estadio de blastocisto eclosionado.

Debido a la naturaleza del trabajo, solamente se buscó evaluar la tasa de desarrollo embrionario obtenido, como producto del protocolo adaptado, así como desarrollado en su totalidad en las condiciones ambientales y disponibles a 4200 msnm.

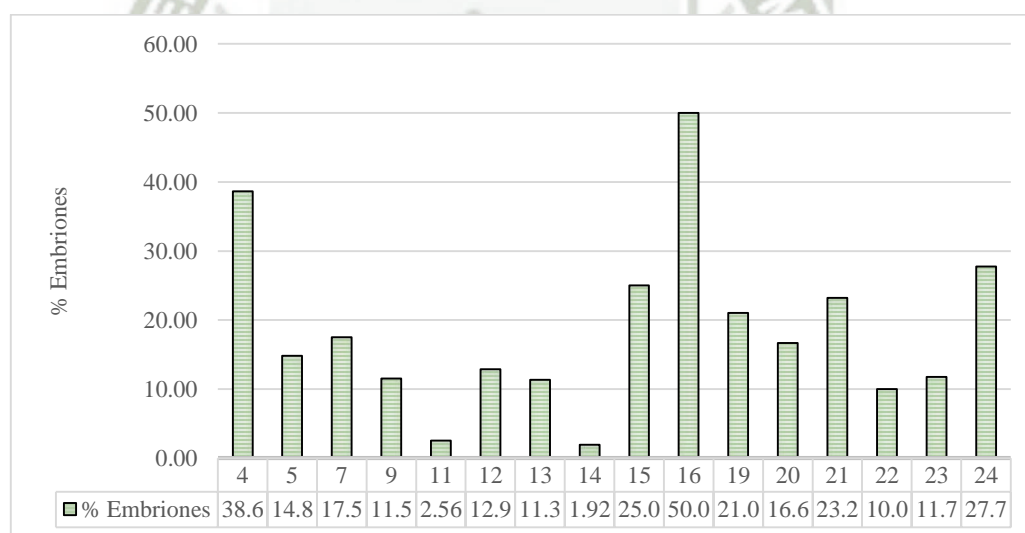


Figura N° 9. Porcentaje de desarrollo embrionario al 7° día.

Como resultado de la evaluación general del desarrollo embrionario obtenido mediante la aplicación del protocolo a 4200 msnm, se obtuvo tasa de desarrollo embrionario variable, siendo la más alta de un 50 % y la más baja de 1.92 %. Para la

determinación del porcentaje de desarrollo embrionario, se tomó en cuenta desde las divisiones de 2 blastómeros hasta el estadio de blastocisto eclosionado.

La variación en cuanto al porcentaje alcanzado se puede deber a diferentes factores como la fuente de obtención de ovarios, ya que los animales de la zona no se encuentran adecuadamente alimentados, también a los factores ambientales tanto de la zona de trabajo como de la época en la que se realizó.

Como se puede observar en la figura N° 10 en algunas corridas realizadas se alcanzó el estadio de mórula y blastocito, siendo este desarrollo dependiente de la calidad de ovocitos recuperados y el nivel de maduración citoplasmática alcanzada. No todas las muestras son iguales, ni de la misma procedencia ni del mismo animal, siendo estos ya factores propios de cada ovocito que determinen el grado de desarrollo que alcanzarían.

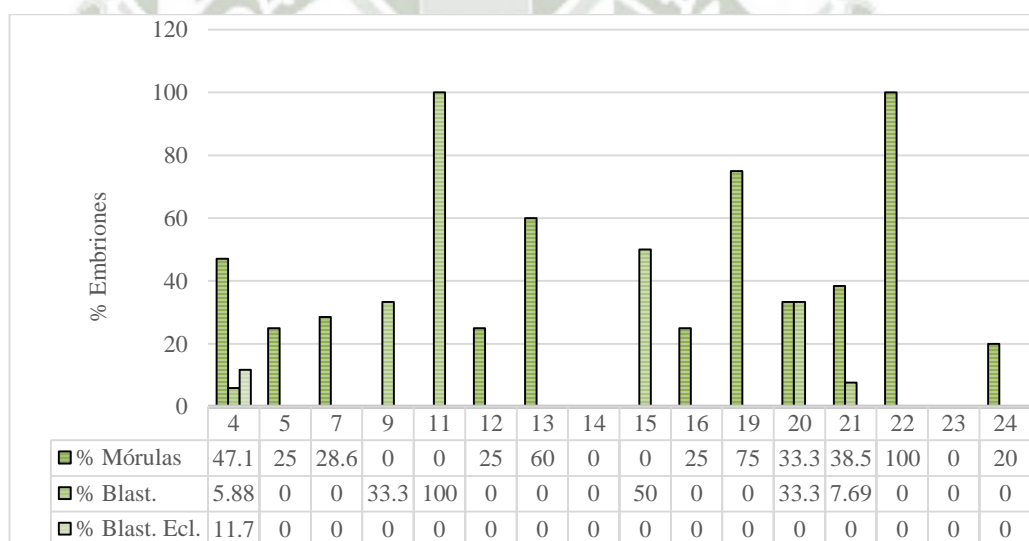


Figura N° 10. Desarrollo embrionario de mórulas y blastocistos al 7° día.

■ Desarrollo de mórulas:

El desarrollo de mórulas como se puede observar en la figura N° 10, fue mayor a comparación del desarrollo de blastocistos, alcanzado porcentajes de desarrollo de los embriones obtenidos en su totalidad, como es el caso de la corrida 22. Esto no nos indica que se haya alcanzado un alto número de mórulas en esa corrida, por el contrario;

solamente indica que del total de cigotos obtenidos, estos en su totalidad llegaron al estadio mencionado.

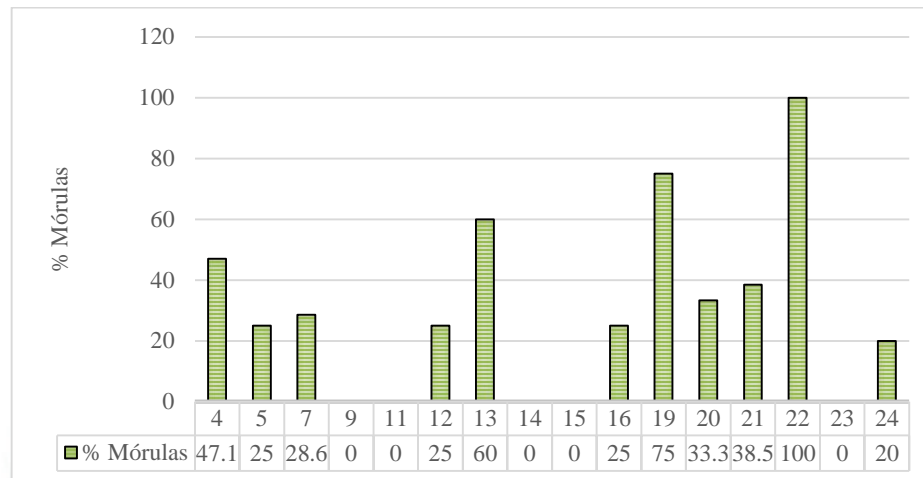


Figura N° 11. Desarrollo embrionario de mórulas por corrida al 7° día.

Las características de las mórulas así como el resto de embriones obtenidos *in vitro* en el presente protocolo responden a diferentes calidades según la International Embryo Transfer Society (IETS) ⁵⁰ para vacunos ya que no se dispone de un manual específico para camélidos. Las características obtenidas se pueden considerar como las siguientes:

- Blastómeros definidos y compactos
- Coloración homogénea y oscura en los blastómeros.
- Zona pelúcida gruesa de coloración característica

Las mismas que se pueden observar en el Anexo 6. . La calidad de las mórulas no fue un aspecto determinante a ser evaluado en la presente investigación, pero se considera como un parámetro que permite analizar los resultados obtenidos.



Figura N° 12. Mórula compacta, evaluada al día 7.

■ Desarrollo de blastocistos:

En los diferentes trabajos realizados, como se verá más adelante; siempre el nivel de blastocistos es menor al total obtenido. Esto se debe a que siempre un porcentaje de los ovocitos madurados y que inician el proceso de división embrionaria, no están totalmente preparados para poder llevar un proceso de división con normalidad y se ven obligados a detener y progreso iniciando su degeneración.

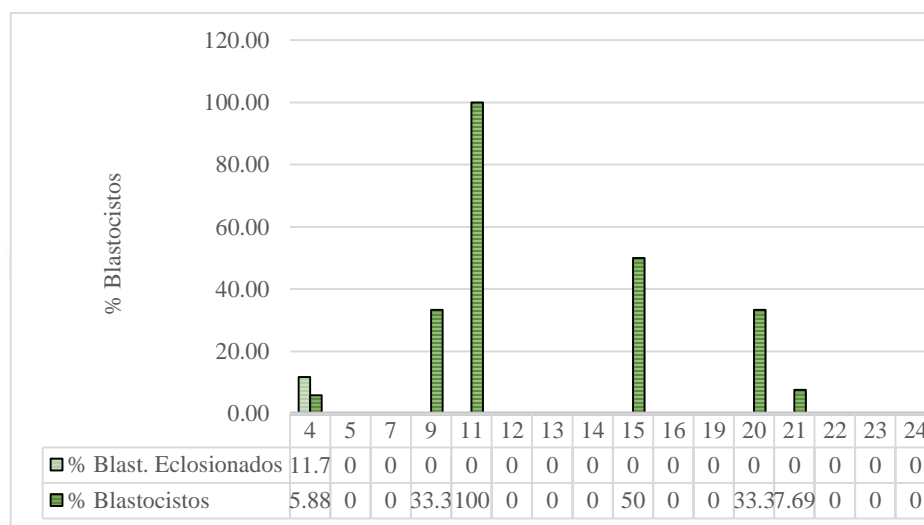


Figura N° 13. Desarrollo embrionario de blastocistos por corrida al 7° día.

En la figura N° 13 se puede observar que de las 16 corridas realizadas solamente 6 han presentado un desarrollo embrionario hasta blastocisto, siendo solamente una la que presentó el máximo desarrollo embrionario alcanzado.

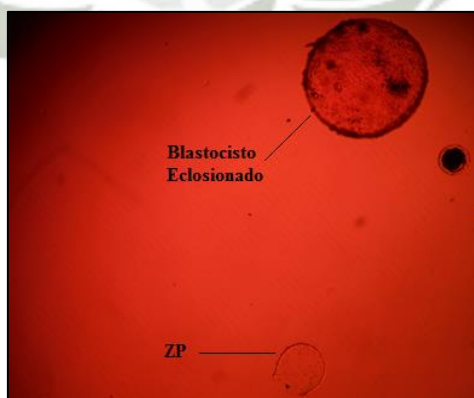


Figura N° 14. Blastocisto eclosionado evaluado a los 7 días.

La calidad de los blastocistos obtenidos también fue variable, los estadios alcanzados fueron diferentes, dentro de los cuales se pudo distinguir blastocistos tempranos, expandidos y eclosionados.

▪ Desarrollo total de mórulas y blastocistos:

Como se muestra en la tabla N° 20, se obtuvo una mayor cantidad de embriones en estadio de mórulas, seguida por las divisiones de 4 blastómeros, 2 blastómeros, para presentar finalmente los valores de blastocistos. Como se mencionó anteriormente esto está claramente definido por la capacidad del ovocito de poder llevar adelante el desarrollo embrionario.

Tabla N° 20. Desarrollo embrionario total del protocolo

Cigotos cultivados	% 2 Blastómeros	% 4 Blastómeros	% Mórulas	% Blastocistos	% B. Eclosionados
84	25.00	30.95	34.52	7.14	2.38

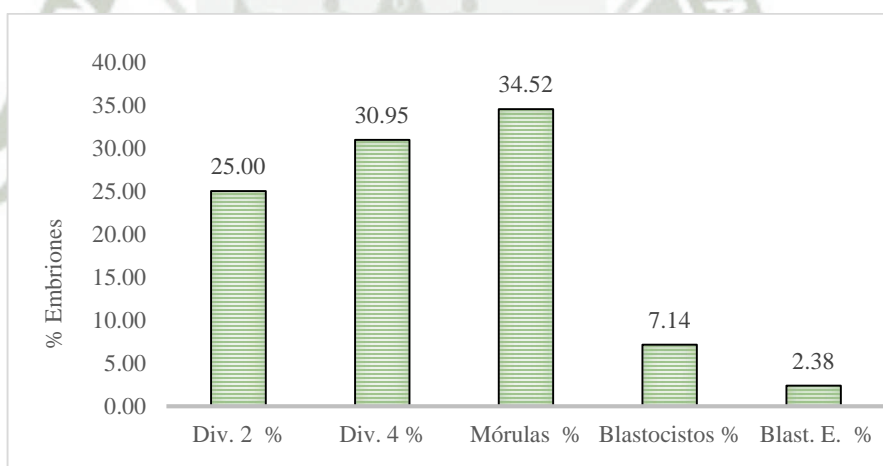


Figura N° 15. Gráfico de desarrollo embrionario total de embriones obtenidos en el protocolo.

La tasa de mórulas y blastocistos eclosionados obtenidos en el desarrollo y evaluación del presente protocolo, fueron mayores que las obtenidas por Gamarra *et al*³⁷ en alpacas (8.0% y 1.14% respectivamente) en inclusive también es superior al obtenido por Del Campo *et al*³³ quien alcanzó una tasa de 5.6% de mórulas. En cuanto a la tasa

de blastocistos obtenida por Del Campo *et al*³³ es superior a la obtenida en esta investigación, habiendo reportado 4.7% de blastocistos eclosionados y 6% de blastocistos tempranos. Esto puede deberse a las diferencias en el cultivo *in vitro* que realizó al añadir células oviductales al medio durante los 9 días de cultivo, ya que está demostrado que las células como los fluidos oviductales son importantes para los eventos reproductivos.⁵¹

Basándonos en el estudio realizado por Huanca *et al*³⁶, conforme se alarga el tiempo de maduración *in vitro* en ovocitos de alpaca, el porcentaje de clivaje es considerablemente mayor, ya que a las 38 horas de MIV la tasa de clivaje fue de 15.4%. Se considera que los resultados obtenidos en el presente trabajo a con 34 horas de MIV, pueden ser mayores siguiendo el patrón establecido por Huanca *et al*³⁶ bajo una maduración más prolongada y una adecuada combinación de hormonas.

En la investigación reportada por Khatir y Anouassi³⁸ realizada en dromedarios, ellos alcanzaron una tasa de clivaje de 64 % y una tasa de blastocisto de 46 %, siendo estos valores altamente considerables. Uno de los principales factores que han podido favorecer el desarrollo de altas tasas de división puede ser el uso de una atmósfera gaseosa de mezcla de gases. La mezcla de gases tiene efectos positivos sobre el desarrollo embrionario⁵² lo que favorece a obtener una mayor tasa de embriones y de una mejor calidad.

Por otro lado, un estudio realizado en la EEA de Canaán de la ciudad de Ayacucho (2746 msnm), donde Contreras *et al*⁵³ reporta considerables tasas de desarrollo embrionario en estadios de mórulas, así como blastocistos de buena y excelente calidad para programas de transferencia de embriones, siendo en este protocolo característica también el uso de una atmósfera gaseosa con mezcla de gases de 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂, corroborando lo anteriormente mencionado.

El protocolo para fertilización *in vitro*, adaptado y evaluado a condiciones ambientales propias de la zona, se ha visto expuesto a las modificaciones consideradas necesarias que permitieron alcanzar una tasa de 34.52% de mórulas, 7.14 % de blastocistos y 2.38 % de blastocistos eclosionados.

CONCLUSIONES

PRIMERA: De ambas técnicas evaluadas al inicio, la técnica de recuperación de ovocitos más efectiva para el presente trabajo fue la de slicing; con la cual se obtuvo 2.63 ovocitos/ovario siendo 28% de categoría I, 44% de categoría II y 28% de categoría III. En contraste con la técnica de aspiración que se recuperó 1.08 ovocitos/ovario; de los cuales 23% fueron de categoría I, 65% de categoría II y 11% de categoría III. Con estos resultados obtenidos, se determinó que la técnica más adecuada para trabajar los ovarios de alpaca es la de slicing, debido a la mayor cantidad de ovocitos recuperados.

SEGUNDA: Los ovarios sin cuerpo lúteo (CL) permiten obtener más ovocitos que los ovarios con CL, (8.25 ± 2.97 ovocitos/ovario frente a los 5.63 ± 1.36 ovocitos/ovario respectivamente). En calidad los ovocitos recuperados de ovarios sin CL también fueron superiores (37.03% ovocitos de categoría I y II) a los ovocitos de ovarios con CL (35.87% ovocitos de categoría I y II). Siendo esta una clara manifestación del efecto hormonal que ejerce el cuerpo lúteo principalmente en el ovario donde se encuentra.

TERCERA: Para las condiciones hormonales trabajadas en el presente protocolo con el fin de completar la maduración del ovocito *in vitro*, se determinó que es necesario 34 horas para alcanzar la expansión de las células del cúmulus (CCs) manteniendo la integridad del ovoplasma, siendo esta manifestación nula a las 24 horas.

CUARTA: Para las condiciones en las cuales se desarrolló el presente trabajo, el método más adecuado de colección de semen en alpacas es el de vagina artificial (VA) con el cual se obtuvo una mayor concentración espermática ($13.44 \pm 9.58 \times 10^6$ esp/ ml) y mayor motilidad ($66.43 \pm 8.02\%$). A comparación del método de electroeyaculación (EE), en el método de vagina artificial no ejerce estrés en el animal, por consiguiente permite una mejor estimulación del macho, y adicionalmente proporciona más protección al eyaculado en las condiciones ambientales propias de la altura.

QUINTA: La técnica de gradiente de densidad se estandarizó para las muestras de semen colectadas por VA y diluidas en una proporción de 1:1 con el dilutor Tris – Citrato - Yema de Huevo. La gradiente que presentó resultados positivos fue la de 45 y 22.5% de Percoll®, con una velocidad de centrifugación a 3500 RPM por 10 minutos. Con la gradiente de 90 y 45 % de Percoll® no se obtuvieron resultados positivos ya que no permite la separación de los espermatozoides del eyaculado diluido. Para las condiciones de altura trabajadas, la adición de un dilutor resulta determinante ya que brinda una protección adicional a los espermatozoides, evitando la aglomeración de sus cabezas debido al manejo y baja temperatura ambiental.

SEXTA: La tasa de fertilización promedio es mayor cuando se fertiliza con concentraciones espermáticas menores a 1×10^6 esp/ml ($22.56 \pm 14\%$) en comparación a las fertilizaciones con concentraciones mayores a esta ($12.57 \pm 11\%$). Presentándose en estas últimas polispermia.

SEPTIMA: Establecidas todas las técnicas para la ejecución general del protocolo, se determinó que la tasa de recuperación promedio alcanzada fue de 7.40 ± 2.70 ovocitos/ovario, presentándose un porcentaje de 19.57% de ovocitos de categoría I y 16% de categoría II, siendo ambas categorías empleadas para la FIV. Estos valores superan nuestras expectativas, siendo claramente un factor determinante la mayor destreza adquirida.

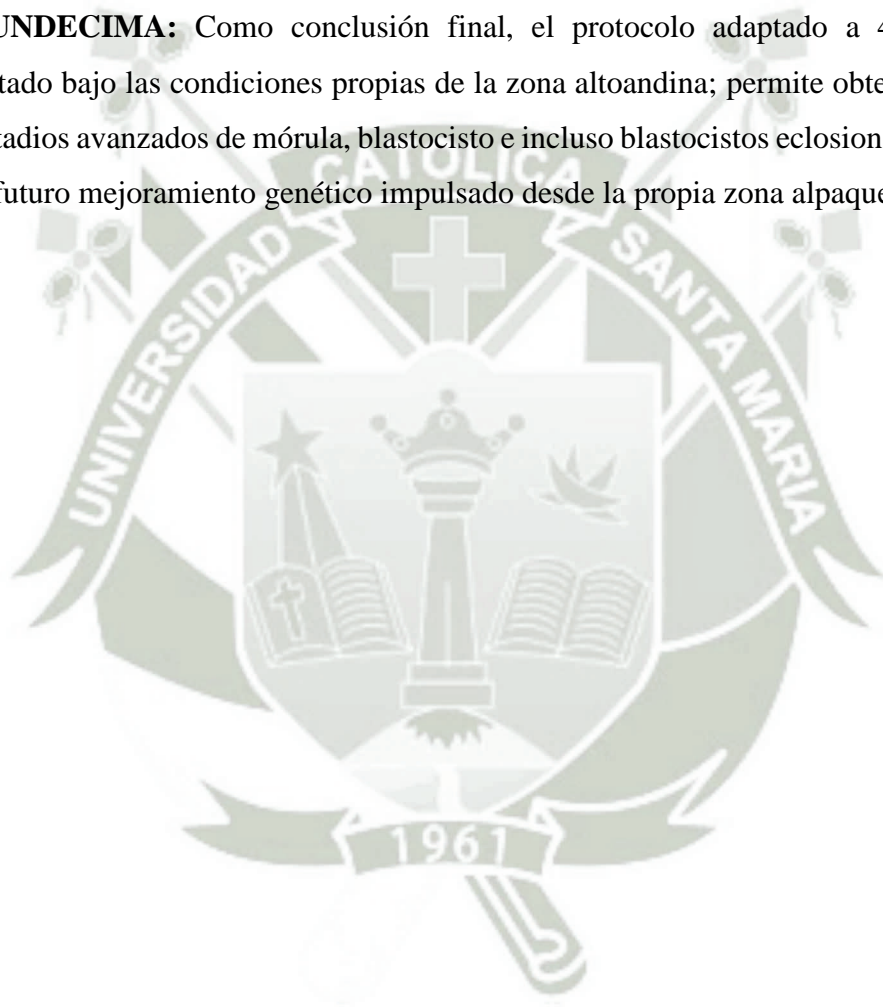
OCTAVA: La tasa promedio de maduración *in vitro* de los ovocitos, obtenida de la ejecución total del protocolo fue de $81.18 \pm 14.86\%$. La alta tasa de maduración *in vitro* alcanzada se debe a que el parámetro de evaluación fue la expansión de las CCs, ya que a comparación de otros métodos, esta técnica no compromete la viabilidad del ovocito.

NOVENA: La tasa de fertilización *in vitro* obtenida en la presente ejecución, alcanzó un valor máximo de 50% de cigotos obtenidos, y una mínima de 1.92%. Estos valores se

deben a diversos factores tanto intrínsecos como extrínsecos de los ovarios recolectados, así como la variabilidad en las muestras de semen colectadas.

DECIMA: El desarrollo embrionario obtenido fue de 25% de embriones de 2 blastómeros, 30.95% de 4 blastómeros, 34.52% de mórulas, 7.14% de blastocistos y 2.38% de blastocistos eclosionados de un total de 84 cigotos cultivados.

UNDECIMA: Como conclusión final, el protocolo adaptado a 4200 msnm y ejecutado bajo las condiciones propias de la zona altoandina; permite obtener embriones en estadios avanzados de mórula, blastocisto e incluso blastocistos eclosionados con miras a un futuro mejoramiento genético impulsado desde la propia zona alpaquera.



RECOMENDACIONES

1. Se recomienda seguir realizando estudios en el área de fertilización *in vitro* y producción de embriones en el CIP Quimsachata para las condiciones de altura, con diferentes protocolos que permitan una comparación para obtener mejores resultados.
2. Evaluar la maduración *in vitro* de ovocitos con la aplicación de diferentes hormonas, y determinar la evaluación basándose en la expulsión del cuerpo polar.
3. Entrenar constantemente a un grupo de machos seleccionados y enfocarse en la alimentación de estos con el fin de poder disponer de ellos para diversos trabajos tanto de investigación seminal como una fuente segura de espermatozoides para trabajos de FIV.
4. Seguir estandarizando, evaluado y ajustando factores como tiempos de fertilización, que permitan incrementar la tasa de blastocistos eclosionados en alpacas del presente protocolo.
5. Ejecutar el mismo protocolo pero con un cultivo en cámara empleando mezcla de gases, ya que esto ayuda mejorar la calidad y cantidad de embriones en estadios avanzados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wheeler J. South American camelids – past, present and future. *Journal of Camelid Science*. 2012; 5:1-24
2. Herradón P, Quintela, Becerra L, et al. *In vitro* fertilization: An alternative for genetic improvement in bovines. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 2007; vol. 15.
3. García W, Pezo D, San Martín F, et al. *Manual del Técnico Alpaquero*. Cusco: ITDG AL; 2005
4. Miragaya M, Chaves M, Agüero A. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research*. 2006; 61: 299-310
5. Huanca W, Cordero A, Huanca T, et al. Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: avances y perspectivas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 2007; Vol 15
6. Jiménez P, Evelyn C, Espada M, et al. South American camelids: classification, origin and characteristics. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 2010; 4(1):23-36
7. Bustinza V. *La alpaca conocimiento del gran potencial andino*. 1ª ed. Puno: Oficina de Recursos del Aprendizaje – Sección Publicaciones – UNA - Puno; 2001
8. Instituto Nacional de Estadística e Informática. *Resultados Definitivos IV Censo Nacional Agropecuario 2012*.
9. Hafez E.S.E, Hafez B. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana editores; 2000

10. Murray E, Bravo W. Medicine and surgery of camelids. 3ª ed. USA: Willey-Blackwell; 2010
11. Gigli I, Russo A, Agüero A. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. InVet. 2006; 8(1):183-204
12. García A, Castejón F, De la Cruz L, et al. Fisiología Veterinaria. 1ª ed. España: McGraw –Hill Interamericana editores; 1995
13. Vaughan J. Ovarian function in south American camelids (alpacas, llamas, vicuñas, guanacos). Animal Reproduction Science. 2010
14. Sinervia Uruguay S.A. Compendio de Reproducción Animal. 9ª ed. Uruguay: Intervet Internacional; 2007
15. Raymundo F, Huanca W, Huanca T, et al. Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpacas. Rev Inv Vet Perú. 2006; 17(2): 125 – 130
16. Palma G. Biotecnología de la Reproducción. 2ª ed. Argentina. 2008
17. Trasorras V. Producción de embriones *in vivo* e *in vitro* en camélidos sudamericanos. Spermova. 2012; 19-21
18. DesCôteaux L, Colloton J, Gnemmi G. Practical Atlas of Ruminant and camelid reproductive ultrasonography. 1ª ed. USA. Wiley-Blackwell
19. Trasorras V, Giuliano S, Miragaya M. *In vivo* e *in vitro* embryo production in South American camelids. Animal Reproduction Science. 2012.

20. Santa Cruz C, Huanca W, Condori R, et al. Uso de macromoléculas sobre la tasa de maduración y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos bovinos. Rev. Inv. Vet. Perú 2014; 25 (4): 487 - 493
21. Lenis Y, Restrepo L, Olivera M, et al. Efecto de la osmolaridad, sobre el diámetro y la calidad de oocitos bovinos madurados *in vitro*. Rev. Lasallista de Investigación 2009; 6(1): 58-66
22. Lorenzo P. Maduración *in vitro* de oocitos de ganado vacuno. Universidad Complutense de Madrid. 1992
23. Bravo W, Moscoso J, Ordoñez C, et al. Transport of spermatozoa and ova in female alpaca. Anim. Reprod. Science. 1996; 43: 173 – 179
24. Pahuara L, Naveros M. *In vitro* production of bovine embryos (*Bos taurus*) in two culture media. Spermoiva 2014; 4(1): 54 - 57
25. Cebra C, Anderson D, Tibary A, et al. Llama and alpaca care. 1ª ed. Canadá
26. Núñez M, Genovese P, Cordero A, et al. Seminiferous tubules development was heterogeneous, alternating and highly ordered in the adult alpaca (*Vicugna pacos*): preliminary results. APPA, Cusco, Perú. 2007
27. Arriaga I, Huanca W, Terreros M, et al. Effect of temperature and time of storage of alpaca ovaries on *in vitro* maturation and cleavage rate of oocytes. Rev. Inv. Vet. Perú 2014; 25(4): 477 – 486
28. Huanca W, Palomino J, Cervantes M, et al. Effect of transport temperatures (35°C, 4°C) on the morphologic quality of oocytes collected from ovaries of alpacas. APPA – ALPA – Cusco, Perú 2007

29. Hernández A, Nava-Trujillo H, Vélchez V. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración *in vitro*. Producción Agropecuaria. 2010; 1: 41-44
30. Huanca W., Condori R., Chileno M, et al. Effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage post *in vitro* fertilization of alpaca oocytes. Rev. Inv. Vet. Perú 2014; 25(4) 468 - 476
31. Leisinger Ca, Coffman EA, Coutinho da Silva MA, et al. Factors affecting *in vitro* maturation of alpaca (*Lama pacos*) oocytes. Animal Reproduction Science. 2014
32. Berland M, Von Baer A, Ruiz J, et al. *In vitro* fertilization and development of cumulus oocytes complexes collected by ultrasound-guided follicle aspiration in super stimulated llamas. Theriogenology. 2011; 75:1482-1488
33. Del Campo M.R, Del Campo C.H, Donos M.X, et al. *In vitro* fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. Theriogenology. 1994; 41:129-1229
34. Ratto M, Berland M., Huanca W, et al. *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes, Theriogenology. 2005; (63): 2445 – 2457
35. Ratto M, Gómez C, Berland M, et al. Effect of ovarian super stimulation on COC collection and maturation in alpacas. Animal Reproduction Science. 2007; (97): 246 -256
36. Huanca W, Condori L, Chileno M.A, et al. *In vivo* maturation and *in vitro* fertilization of alpaca oocytes. Reproduction, Fertility and Development. 2010; 23 (1): 204 – 205

37. Gamarra G, Huamán E, León S, et al. First *in vitro* embryo production in alpacas (*Lama pacos*). *Reproduction, Fertility and Development*. 2008; 21(1): 177 – 178
38. Khatir H, Anouassi A. The first dromedary (*Camelus dromedarius*) offspring obtained from *in vitro* matured, *in vitro* fertilized and *in vitro* cultured abattoir-derived oocytes. *Theriogenology*. 2006; 65: 1727-1736
39. Trasorras V, Baca Castex C, Alonso A, et al. First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after *in vitro* fertilization and *in vitro* culture of gametes from live animals. *Animal Reproduction Science*. 2014
40. Salgado R, Vergara O, Ramírez L. Effect of gonadotropins on the maturation and embryo development of bovine oocytes cultured *in vitro*. *Rev. MVZ Córdoba*. 2010; 15(1): 1954-1960
41. Lichtenwalner A, Woods G, Weber J. Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. *Theriogenology*. 1996; 46:293-305.
42. Garnica J, Achata R, Bravo W. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science*. 1993; 32: 85-90
43. Kershaw-Young C, Maxwell W. Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. *Reprod. Dom. Anim* 2012; 47: 369-375
44. Huanca T, Mamani R, Naveros M, et al. Variación individual y estacional de las características seminales en la alpaca (*Vicugna pacos*). *Spermova* 2011; 1: 98-100 (Resumen)

45. Morton KM, Thomson PC, Bailey K, et al. Quality parameters for alpaca (*Vicugna pacos*) semen are affected by semen collection procedure. *Reprod. Dom Anim.* doi, 2008
46. Kershaw – Young C, Maxwell W. The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology* 2011; 76: 1197-1206
47. Bravo W, Flores D, Ordoñez C. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. *Biology of Reproduction* 1997; 57:520-524
48. Fernández A, Díaz T, Muñoz G. *In vitro* production of bovine embryos. *Rev. Fac. Cs. Vets.* 2007; 48 (1): 51 -60
49. Chávez S, Chávez D, Montoya G, et al. El efecto del medio M-199 y Sperm-talp sobre la capacitación espermática y fertilización de ovocitos de bovino madurados *in vitro*. CUCBA. 2008. Avances
50. Bovine *In Vivo* Embryo Slide set tutorial. International Embryo Transfer Society. 2010
51. Apichela S, Argañaraz M, Zampini R, et al. Biochemical composition and protein profile of alpaca (*Vicugna pacos*) oviductal fluid. *Animal Reproduction Science.* 2015
52. Lim J, Reggio B, Godke R, et al. Development of *in vitro* derived bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. *Human Reproduction* 1999; 14: 458 -464

53. Contreras M, Olaguivel C, Naveros M. Evaluación de la calidad de embriones producidos por fertilización *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*). XXXVII Reunión científica anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Abancay 2014
54. Rynkowska A, Rapala L, Trzeciak P, et al. The application of *in vitro* cattle embryo production system to study the influence of elevated temperature on oocyte maturation, fertilization and early embryonic development. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology. 2011; 92(1): 45-53



ANEXOS

ANEXO 1. ANATOMÍA DE LA ALPACA

1.1. Anatomía del aparato reproductor de la alpaca hembra

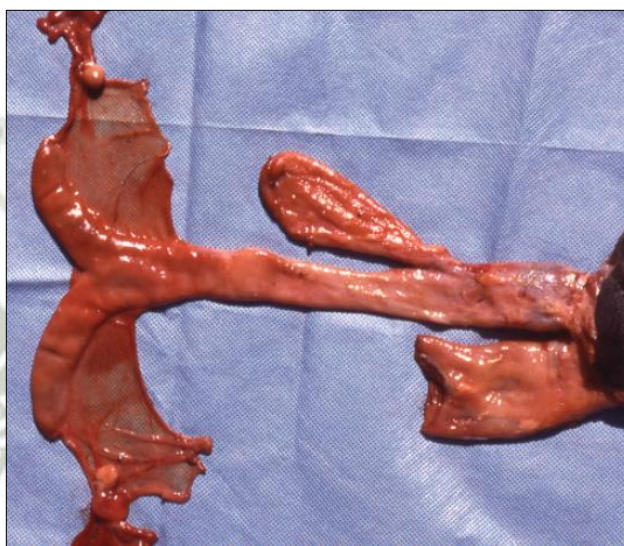


Figura N° 16. Aparato reproductor de la alpaca.⁵⁵

1.2. Anatomía del aparato reproductor de la alpaca macho



Figura N° 17. Aparato reproductor del camélido macho.⁵⁵

ANEXO 2. FISIOLÓGÍA DE LA ALPACA

2.1. Fisiología de la alpaca hembra

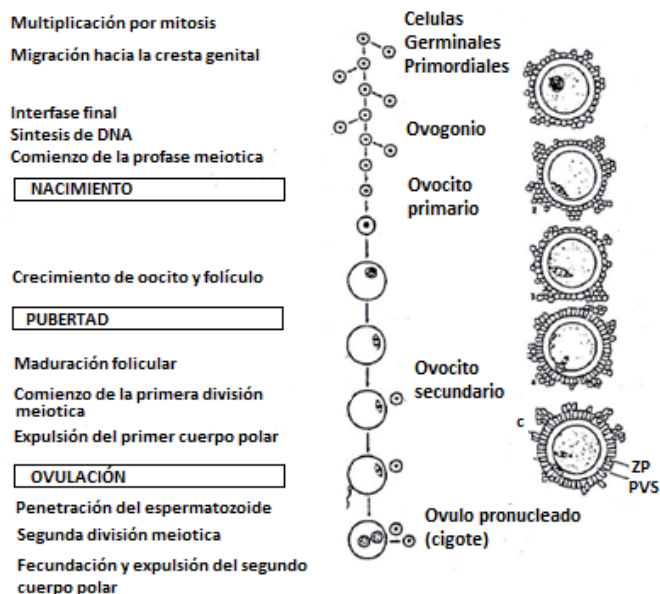


Figura N° 18. Ovogénesis en mamíferos. Adaptado a partir de Hafez ⁹

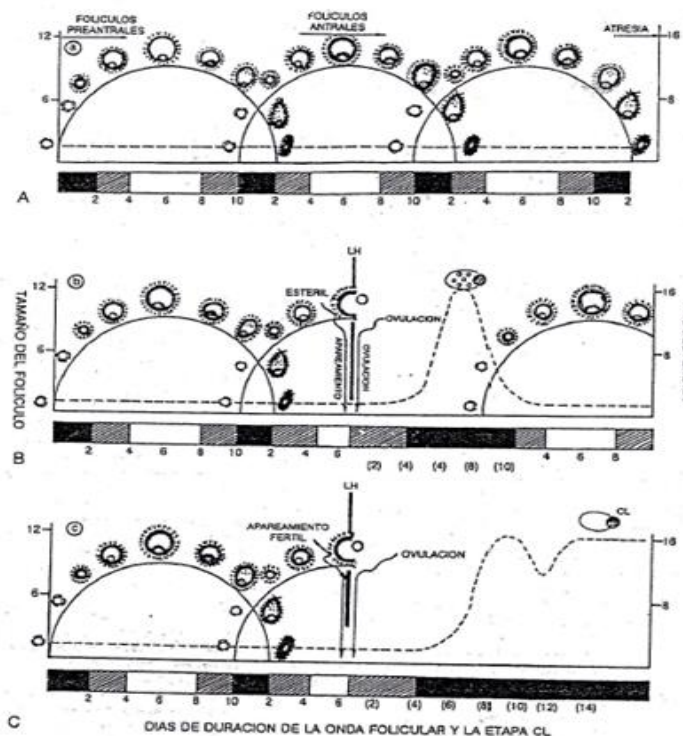


Figura N° 19. Dinámica folicular de la alpaca.⁹

2.1. Fisiología de la alpaca macho

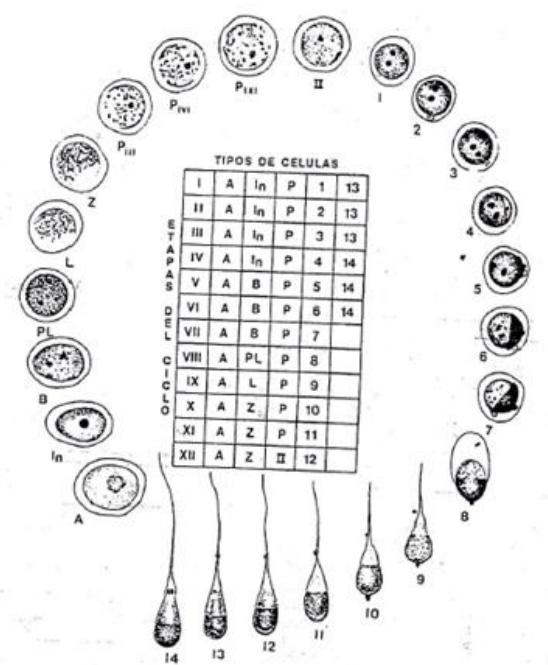


Figura N° 20. Los distintos pasos de la espermatogénesis en el toro. ⁹

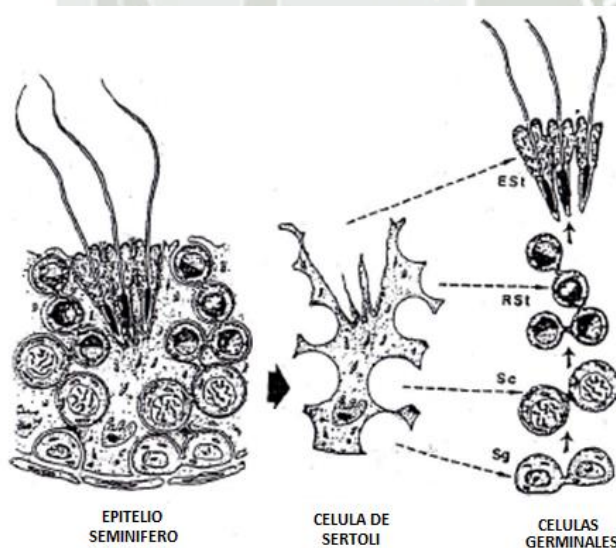


Figura N° 21. Epitelio seminífero que muestra la naturaleza compleja de la asociación entre células de Sertoli y las células germinales en desarrollo. ⁹

2.2. Desarrollo embrionario












Localización	Día	Desarrollo		Día	Desarrollo	
Itsmo	0 - 2	Una célula		5 - 7	Mórula Compacta	
Itsmo	1 - 3	Dos células		7 - 8	Blastocisto temprano	
Unión istmica ampular	2 - 3	Cuatro células		7 - 9	Blastocisto	
Unión istmica ampular	3 - 5	Ocho células		8 - 10	Blastocisto expandido	
Utero	4 - 5	Dieciséis células		9 - 11	Liberación del blastocisto	
Utero	5 - 6	Mórula				

Figura N° 22. Etapas del desarrollo temprano en el embrión bovino. ⁹

ANEXO 3. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Centros de colección de ovarios



Figura N° 23. Centros de recolección de ovarios. (A) Camal Municipal de Nuñoa.
(B) Centro de beneficio familiar

3.2. Limpieza y selección de los ovarios



Figura N° 24. Lavado, selección y clasificación de los ovarios recolectados de matadero.

3.3. Técnica de Slicing



Figura N° 25. Recuperación de ovocitos mediante la técnica de slicing modificado.

3.4. Clasificación de los ovocitos recuperados

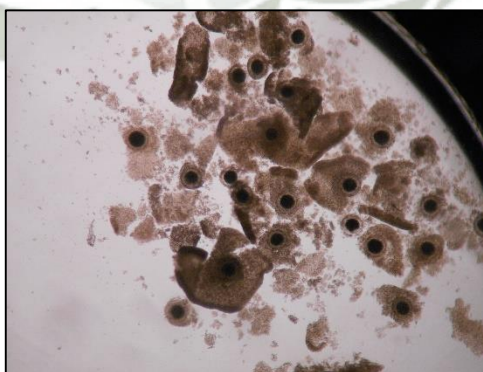


Figura N° 26. Ovocitos recuperados por slicing de ovarios de matadero.

3.5. Suplementación de los machos



Figura N° 27. Suplementación vitamínica vía intramuscular a los machos de colección.

3.6. Colección de semen



Figura N° 28. Colección de semen con VA en maniquí (der.) Vagina artificial (izq.)

3.7. Efecto de la concentración espermática en la tasa de fertilización

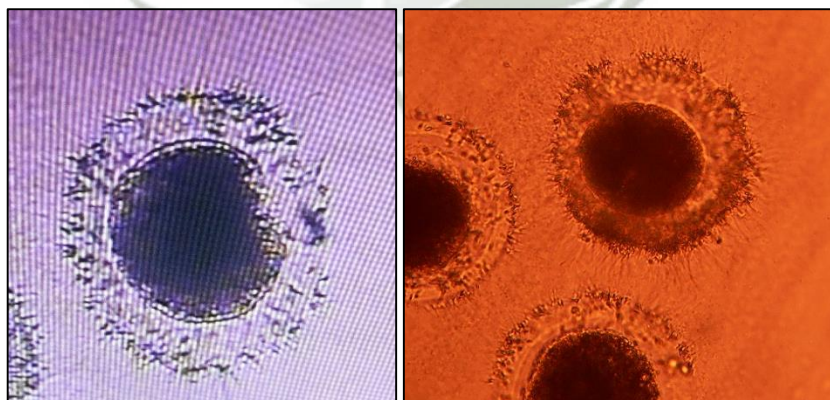


Figura N° 29. Ovocitos detenidos en su desarrollo por polispermia.

ANEXO 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1. Recuperación de ovocitos por Slicing



Figura N° 30. Ovocitos recuperados por slicing en sus diferentes categorías

4.2. Maduración *in vitro*

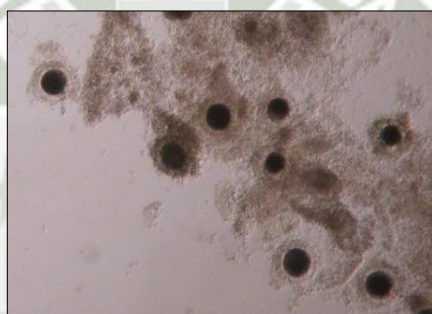


Figura N° 31. Expansión de las CCs que indican la maduración *in vitro* de los ovocitos.

4.3. Estandarización de la G. de Percoll ®

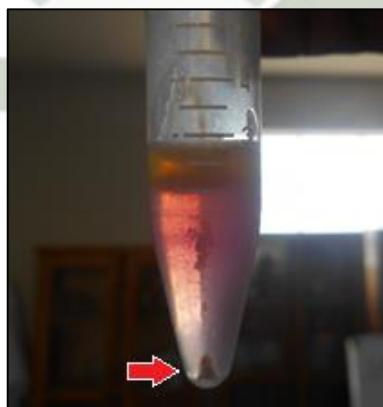


Figura N° 32. Formación del pellet en la base del tubo como producto de la estandarización de la gradiente de Percoll ®

ANEXO 5. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE RESULTADOS DE LA ADAPTACIÓN Y EVALUACIÓN DEL PROTOCOLO A 4200 MSNM

5.1. Recuperación y clasificación de ovocitos

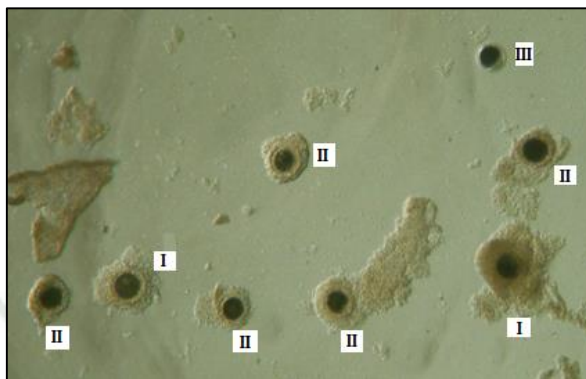


Figura N° 33. Clasificación de los ovocitos recuperados en tres categorías I, II y III

5.2. Maduración *in vitro*



Figura N° 34. Cuerpo polar (CL) en el espacio previtelino del ovocito maduro.

5.3. Cultivo *in vitro* y desarrollo embrionario



Figura N° 35. Desarrollo de embriones en diferentes estadios producto de la FIV.

ANEXO 6. REGISTRO FOTOGRÁFICO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO OBTENIDO

Desarrollo Embrionario: 2 blastómeros

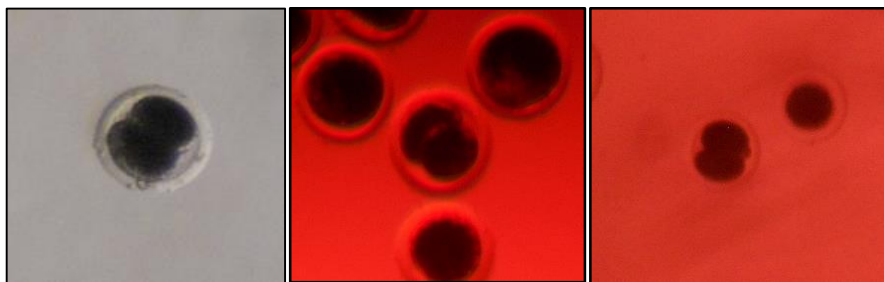


Figura N° 36. Desarrollo embrionario a las 24 horas

Descripción: En estas imágenes se puede observar embriones en división de dos blastómeros, correspondientes a las 24 horas de haber realizado la fertilización *in vitro*. Sin embargo, algunas de las divisiones presentadas fueron tomadas al día 7; ya que se detuvo su desarrollo en algún momento por diferentes causas.

Desarrollo Embrionario: 4 blastómeros



Figura N° 37. Desarrollo embrionario a las 48 horas

Descripción: En estas imágenes el desarrollo embrionario progresó hasta una división de 4 blastómeros. La imagen corresponde a la evaluación realizada a las 48 horas post- fertilización. En algunos casos la división de las blastómeros no resulta siendo regular en cuanto al tamaño de estas; esto puede ser un indicador claro de que su desarrollo se verá detenido en alguna etapa.

Desarrollo Embrionario: Mórulas



Figura N° 38. Desarrollo embrionario al 6 día

Descripción: El desarrollo en etapa de mórula fue notorio en algunos casos; aunque en algunos se requirió visualizarlos en microscopio con ayuda de una cámara de video incorporada. Se puede observar claramente el contorno irregular formado por los blastómeros. La ZP a diferencia de los blastocisto posee mayor grosor. Las fotos corresponden al día 6 de evaluación

Desarrollo Embrionario: Blastocisto



Figura N° 39. Desarrollo embrionario al 7 día

Descripción: En las diferentes imágenes, se puede observar embriones en etapa de blastocisto, desde blastocisto temprano que inicia la formación del blastocele, hasta blastocistos expandidos en proceso de ecolisión (imagen del centro). Estas imágenes fueron obtenidas al día 7 de evaluación. Claramente la zona pelúcida adelgaza y se visualiza una porción más clara dentro del ovoplasma, lo que indicaría la formación del blastocele.

Desarrollo Embrionario: Blastocisto eclosionado

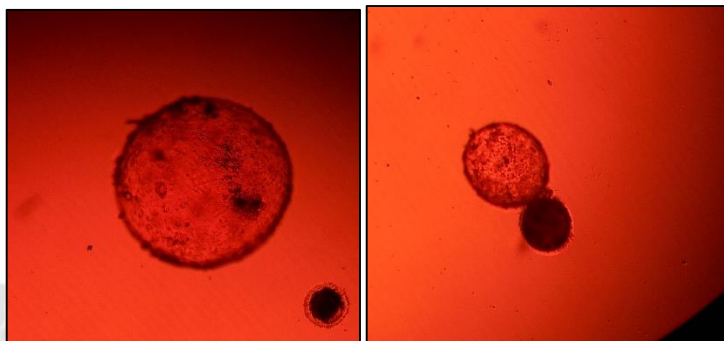



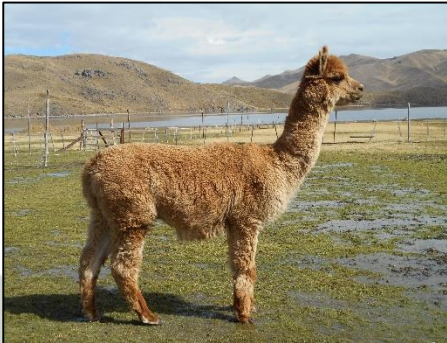
Figura N° 40. Blastocistos eclosionados al 6 día

Descripción: En las dos últimas imágenes se observa dos blastocistos eclosionados con un tamaño de 480 μm el de la izquierda y 260 μm el de la derecha, ambos de diferentes ovocitos fertilizados. Encontrándose en el desarrollo más avanzado de blastocisto en una etapa final de cultivo *in vitro*. Estos blastocistos corresponden a la categoría de excelente y pueden ser empleados en transferencia de embriones. Esta etapa de desarrollo es difícil de alcanzar, para lo cual se requiere de más trabajos de estandarización de los diferentes protocolos ya existentes; siendo no ajeno el protocolo alcanzado en este proyecto.

**ANEXO 7. FICHAS DE LOS MACHOS DE COLECCIÓN DE SEMEN CIP
QUIMSACHATA (AGOSTO - NOVIEMBRE 2014)**


ID Macho	339208	
Edad	6 años	
Raza	Suri	
Color	Café	
Electroeyaculaciones	Si	
Recolección Maniquí	Regular	
Calificación del Donador	Buena	
Observaciones	<ul style="list-style-type: none">- Presentó una buena concentración espermática- No presentó contaminación en su eyaculado- Moderada dificultad en la colección- Monta maniquí con dificultad	

ID Macho	147105	
Edad:	9 años	
Raza	Suri	
Color	Negro	
Electroeyaculaciones	Si	
Recolección Maniquí	Regular	
Calificación del Donador	Buena	
Observaciones	<ul style="list-style-type: none">- Moderada dificultad en la colección- Monta maniquí- Presenta interés por el maniquí- No se acomoda en la monta	

ID Macho	0-00375	
Edad:	Sin registro	
Raza	Huacayo	
Color	Café	
Electroeyaculaciones	No	
Recolección Maniquí	Si	
Calificación del Donador	Buena	
Observaciones	<ul style="list-style-type: none"> - Buena Concentración espermática - Monta maniquí - Presenta interés por el maniquí 	

ID Macho	S.R.	
Edad:	Sin registro	
Raza	Huacayo	
Color	Café Rojizo	
Electroeyaculaciones	SI	
Recolección Maniquí	No	
Calificación del Donador	Buena	
Observaciones	<ul style="list-style-type: none"> - Proporciona semen por electroeyaculación - Dificultad alta de recolección. - No presenta interés por el maniquí. 	

ID Macho	S.R.	
Edad:	Sin registro	
Raza	Huacayo	
Color	Api	
Electroeyaculaciones	No	
Recolección Maniquí	SI	
Calificación del Donador	Buena	
Observaciones	<ul style="list-style-type: none"> - Presenta interés por el maniquí - Proporcionó un buen volumen. - Buena concentración 	

ID Macho	137210	
Edad:	4 años	
Raza	Huacayo	
Color	Blanco	
Electroeyaculaciones	No	
Recolección Maniquí	SI	
Calificación del Donador	Buena	
Observaciones	<ul style="list-style-type: none"> - Presenta interés por el maniquí - Proporcionó un buen volumen. - No proporciona semen con regularidad. 	

ANEXO 8. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE MEDIOS

Los medios en su totalidad fueron preparados con agua bidestilada y procesada en el equipo mili-Q (MILLIPORE) totalmente estéril. Las sales en su mayoría fueron de la marca SIGMA y todo el procedimiento excepto el pesado se realizó en cámara de flujo laminar. Algunos medios se prepararon en base a sus soluciones madre o stock, las mismas que se pueden ser almacenadas por una semana de preferencia.

8.1. Medio de Transporte de Ovarios

Composición:

Tabla N° 21. Composición del medio de transporte

Reactivo	Cantidad
Agua mili-Q	1000 ml
Antibiótico-antimicótico	10 ml
NaCl	9 g

- Preparación: Se pesó 9.00 gramos de cloruro de sodio (NaCl) en la balanza analítica; después se agitó suavemente en 500 ml de agua mili-Q hasta disolver la sal completamente. Se enrasó la solución en probeta hasta un volumen final de 1000 ml con agua mili-Q. Se colocó en un frasco Roux de 1000 ml y se rotuló con la fecha de preparación.

Al momento de emplear el medio de transporte, se calentó a 38.5 °C y se colocó 10 ml del antibiótico – antimicótico para un volumen de 1000 ml.

8.2. Medio de Lavado de Ovocitos

Composición:

Tabla N° 22. Composición del medio de lavado

Reactivo	Cantidad
SOF HEPES stock	200 ml
L – Glutamina	2 ml
Piruvato	600 µl
Gentamicina	200 µl
Aminoácidos Esenciales	4 ml
Aminoácidos No Esenciales	2ml

- Preparación: En un frasco Roux, se colocó 150 ml de solución SOF HEPES stock, y se añadió cuidadosamente y en orden de relación los aditivos que figuran en la tabla N°3. Se enrasó en una probeta a un volumen final de 200 ml con la solución SOF HEPES stock, para finalizar la preparación se ajustó el pH a 7.4. El medio se esterilizó por filtración empleando una jeringa de 20 ml y un filtro millipore (22 μ m). Para su almacenamiento se filtró directamente en un frasco Roux estéril de 200 ml, rotulado con el nombre y la fecha de preparación.

8.3. Medio de Maduración

- Composición:

Tabla N° 23. Composición del medio de maduración

Reactivo	Cantidad
TCM - 199	10 ml
FCS	1 ml
FSH	10 μ l
HcG	100 μ l
Piruvato	30 μ l
Gentamicina	10 μ l
17 β - estradiol	10 μ l

- Preparación: En un tubo falcon estéril se colocó 5 ml de medio TCM 199 y se añadió los aditivos en el orden en el cual se muestran en la tabla N° 4 a excepción del 17 β estradiol. Se enrasó empleando medio TCM-199 en una jeringa a un volumen final de 10 ml. Se esterilizó por filtración con la misma jeringa donde se enrasó, empleando un filtro millipore (22 μ m). No es necesario ajustar el pH de este medio. Finalmente antes de su almacenamiento, se adicionó el 17 β estradiol para posteriormente homogenizarlo. Se rotuló con el nombre del medio y la fecha de preparación.

8.4. Medio SPERM – TALP

- Composición:

Tabla N° 24. Composición del medio SPERM - TALP

Reactivo	Cantidad
Sol. SPERM-TALP Stock	10 ml
Piruvato	100 µl
BSA (V)	0.03 g
Gentamicina	10 µl

- Preparación: En un tubo falcon estéril, se colocó 5 ml de la solución stock de SPERM-TALP, y seguidamente se añadieron los aditivos. Se enrasó con la solución stock de SPERM-TALP empleando una jeringa hasta un volumen final de 10 ml. Se esterilizó por filtración empleando un filtro millipore (22 µm) para seguidamente rotularlo con el nombre y la fecha de preparación.

8.5. Medio FERTIL – TALP

- Composición:

Tabla N° 25. Composición del medio FERTIL-TALP

Reactivo	Cantidad
Sol. FERTIL-TALP Stock	10 ml
Piruvato	25 µl
BSA FAF	0.06 g
Gentamicina	10 µl

- Preparación: En un tubo falcon estéril, se colocó 5 ml de la solución stock de FERTIL-TALP, y seguidamente se añadieron los aditivos considerados. Se enrasó empleando la solución stock de FERTIL-TALP hasta un volumen final de 10 ml. Finalmente se esterilizó por filtración con un filtro millipore (22 µm) para seguidamente rotularlo con el nombre y la fecha de preparación.

8.6. Medio KSOMaa

- Composición:

Tabla N° 26. Composición del medio KSOMaa

Reactivo	Cantidad
Sol. KSOM Stock	10 ml
L - Glutamina	100 μ l
Piruvato	30 μ l
Gentamicina	10 μ l
EDTA	10 μ l
AA Esenciales	200 μ l
AA No Esenciales	100 μ l
BSA FAF	0.010 g

- Preparación: En un tubo falcon estéril, se colocó 5 ml de la solución KSOM stock, y seguidamente se añadieron los aditivos en el orden que figuran en la tabla N° 7. Después de añadir cada aditivo, se agitó suavemente para homogenizar el medio. Se enrasó con la solución KSOM stock hasta un volumen final de 10 ml. Finalmente se esterilizó por filtración empleando un filtro millipore (22 μ m) para seguidamente rotularlo con el nombre del medio y la fecha de preparación.

8.7. Medio SOFaa

- Composición:

Tabla N° 27. Composición del medio SOFaa

Reactivo	Cantidad
Sol. SOF Stock	10 ml
L - Glutamina	100 μ l
Piruvato	30 μ l
Gentamicina	10 μ l
AA Esenciales	200 μ l
AA No Esenciales	100 μ l
FCS	500 μ l
Glucosa	0.26

- Preparación: En un tubo falcon estéril, se colocó 5 ml de la solución SOF stock, y seguidamente se añadieron los aditivos en el orden que se muestran. Después de añadir cada aditivo, se agitó suavemente para homogenizar el medio. Se enrasó con la solución SOF stock hasta un volumen final de 10 ml y finalmente se esterilizó por filtración empleando un filtro millipore (22 μ m) para posteriormente rotularlo con el nombre del medio y la fecha de preparación.

8.8. Dilutor Tris – Yema de huevo

- Composición:

Tabla N° 28. Composición del dilutor Tris – Yema de huevo.

Reactivo	Cantidad
Agua mili - Q	10 ml
TRIS	0.36 g
Ácido Cítrico	0.19 g
Fructosa	0.05 g
Gentamicina	0.2 ml
Yema de Huevo	1.5 ml

- Preparación: En un tubo falcon estéril, se colocó 5 ml de agua mili-Q y se disolvieron todos los componentes del dilutor. Se añadió 1.5 ml de yema de huevo y se homogenizó empleando el vórtex. Se enrasó a un volumen final de 10 ml y se homogenizó todo el dilutor. Finalmente se rotuló con el nombre y la fecha de preparación.

ANEXO 9. FICHAS DE REGISTRO DEL INGRESO DE MUESTRAS Y CORRIDAS

RECUPERACION DE OVOCITOS HOJA DE DATOS

COD: R.O. - 01 – 07 /08 /2014

Corrida: N° 1

Fecha: Jueves 07 de agosto del 2015

Hora Inicio de Colección	11:00
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	13:10
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	20:00

Fuente de recolección: Camal Municipal Nuñoa

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	43
Ovarios con Cuerpo Lúteo	
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	
Temperatura de Llegada	19.5 °C

Observaciones:

- La recolección de los ovarios se realizó post-beneficio.
- La recolección manejó un tiempo aproximado de 7 horas de retraso en la extracción.
- Los ovarios al momento de su recolección ya se encontraban de 5 a 10 °C aprox.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.5 °C
Hora Inicio	22:00
Hora Termino	00:46
Metodología	- Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Gran cantidad de ovocitos en categoría C
- Ovocitos con predisposición a perder las células del cúmulus.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. - 01 – 07 /08 /2014

Corrida: N° 1

Fecha: Jueves 07 de agosto del 2015

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	43	
Con Cuerpo Lúteo	9	
Sin Cuerpo Lúteo	15	
Ovocitos Recuperados Totales	43	
Clasificación		
Categoría I	20	
Categoría II	39	
Categoría III	17	
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN SLICING	2.6315	Ovocitos/Ovario
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN ASPIRACIÓN	1.0833	Ovocitos/Ovario

Observaciones:

- El bajo promedio de recuperación se puede deber a la influencia y las condiciones en las que se encontraban los ovarios al momento de ser recolectados.

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. – 01 - 07 /08 /2014

Fecha de Corrida: 7 de Agosto del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. - 01 – 07 /08 /2014
Hora de Inicio MIV	00:49

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	24, 32 y 34 horas
----------------------	-------------------

PLACA I				
Evaluación Preliminar y Cualitativa			Fecha: 09/08/2014	
N° Pocillos	N° Ovocitos	M – 24 horas	M – 32 horas	M – 34 horas
1	10	-	+	++
2	17	-	+	++
TOTAL	27			

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. - 02 – 21 /08 /2014

Corrida: N° 2

Fecha: 21 de Agosto del 2014

Hora Inicio de Colección	10:00 am
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	01:15 pm
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	06:55 pm

Fuente de recolección: Camal Municipal Nuñoa

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	44
Ovarios con Cuerpo Lúteo	23
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	21
Temperatura de Llegada	S.R.

Observaciones:

- Mayor presencia de ovarios con CL
- Fragmentación folicular del ovario, dificulta la recuperación de ovocitos.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.5 °C
Hora Inicio	07:15 pm
Hora Termino	01:49 am
Metodología	- Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (-)

Observaciones:

- Se recomienda a futuro manejar mejor la Temperatura de trabajo y mantenimiento.
- Disminuir el tiempo de recuperación.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. - 02 – 21 /08 /2014

Corrida: N° 2

Fecha: 21 de Agosto del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	44
Con Cuerpo Lúteo	23
Sin Cuerpo Lúteo	21

Ovocitos Recuperados Totales	166	
Clasificación		
Categoría I	35	
Categoría II	71	
Categoría III	60	
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	3.77	Ovocitos/Ovario

Observaciones:

- Los folículos pre-ovulatorios al momento del corte se comprimen, guardando al COCs o sino liberándolo desnudo.

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. - 02 – 21 /08 /2014

Fecha de Corrida: 21 de Agosto del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. - 02 – 21 /08 /2014
Hora de Inicio MIV	01:49 am

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 03:49 pm	Fecha: 23-08-2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	27	25	2	I
2	50	50	-	II
5	21	21	-	II
6	8	8	-	I
TOTAL	106	104	2	

% MADURACION	98.11
% MADURACIÓN "I"	97.40
% MADURACIÓN "II"	100*

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. - 03 – 28 /08 /2014

Corrida: N° 3

Fecha: 29 de Agosto del 2014

Hora inicio de colección	10:00
Hora de partida Nuñoa – CIP Quimsachata	12:40
Hora de llegada al CIP Quimsachata	18:30

Fuente de recolección: Camal Municipal Nuñoa

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	50
Ovarios con Cuerpo Lúteo	25
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	25
Temperatura de Llegada	34.4 °C

Observaciones:

- Buena temperatura de llegada de los ovarios.
- Procedencia de los ovarios de alpacas gestantes (mitad de ovarios con CL)

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	37.90 °C
Hora Inicio	19:30
Hora Termino	01:30
Metodología	- Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Los ovocitos que durante los lavados o proceso de extracción, disminuían sus células del cúmulo, automáticamente eran contados de categoría B o C según correspondió.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. - 03 – 28 /08 /2014

Corrida: N° 3

Fecha: 29 de Agosto del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	50	
Con Cuerpo Lúteo	25	
Sin Cuerpo Lúteo	25	
Ovocitos Recuperados Totales	284	
Clasificación		
Categoría I	55	
Categoría II	47	
Categoría III	182	
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	5.68	Ovocitos/Ovario

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. - 03 – 28 /08 /2014

Fecha de Corrida: 29 de Agosto del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. - 03 – 28 /08 /2014
Hora de Inicio MIV	01:31

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 01:31 am	Fecha: 28-08-2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	45	38	7	I
2	10	8	2	I
5	18	12	6	II
6	29	12	17	II
TOTAL	102	70	2	

% MADURACION	68.62
% MADURACIÓN "I"	83.63
% MADURACIÓN "II"	51.06

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. - 04 – 11/09 /2014

Corrida: N° 4

Fecha: Jueves 11 de Septiembre del 2014

Hora Inicio de Colección	11:00
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	13:00
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	18:40

Fuente de recolección: Camal Municipal Nuñoa

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	41
Ovarios con Cuerpo Lúteo	21
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	20
Temperatura de Llegada	35.1°C

Observaciones:

- Presencia de Folículos endurecidos y la presencia del CL.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.4 °C
Hora Inicio	19:22
Hora Termino	23:29
Metodología	- Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Sin observaciones relevantes.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. - 04 – 11/09 /2014

Corrida: N° 4

Fecha: Jueves 11 de Septiembre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	37
Con Cuerpo Lúteo	18
Sin Cuerpo Lúteo	19
Ovocitos Recuperados Totales	237
Clasificación	
Categoría I	34
Categoría II	56
Categoría III	147
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	6.40
	Ovocitos/Ovario

Observaciones:

- Los ovarios con CL presentaron pocos folículos y una baja calidad de ovocitos.
- Los ovarios con CL presentaban muchas irrigaciones.

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. -04 – 11/09/2014

Fecha de Corrida: 11 de Septiembre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. - 04 – 11/09 /2014
Hora de Inicio MIV	23:29

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 09:37	Fecha: 13-09-2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	24	19	5	I
3	10	10	0	I
2	33	25	8	II
4	23	18	5	II
TOTAL	90	72	18	

% MADURACION	80.0
% MADURACIÓN "I"	85.29
% MADURACIÓN "II"	76.78

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. - 05 – 18 /09 /2014

Corrida: N° 5

Fecha: 18 de Septiembre del 2014

Hora Inicio de Colección	08:40
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	13:00
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	18:00

Fuente de recolección: Camal Municipal Nuñoa

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	22
Ovarios con Cuerpo Lúteo	11
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	11
Temperatura de Llegada	35.5 °C

Observaciones:

- Presencia de cuerpos hemorrágicos
- Cuerpo ovárico endurecido
- La mayoría de las alpacas debe haber estado en gestación

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.9 °C
Hora Inicio	19:42
Hora Termino	22:54
Metodología	<ul style="list-style-type: none"> - Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Los ovarios que presentaron CL no presentan una buena cantidad de ovocitos, así como tampoco presentan una buena calidad de estos, predominando los ovocitos de categoría C.
- Los ovarios que presentaban cuerpos hemorrágicos no se trabajaron debido a la abundancia de vasos sanguíneos.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. - 05 – 18 /09 /2014

Corrida: N° 5

Fecha: 18 de Septiembre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	21
Con Cuerpo Lúteo	10
Sin Cuerpo Lúteo	11
Ovocitos Recuperados Totales	111
Clasificación	
Categoría I	28
Categoría II	19
Categoría III	64
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	5.28
Ovocitos/Ovario	

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. - 05 – 18 /09 /2014

Fecha de Corrida: 18 de Septiembre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. - 05 – 18 /09 /2014
Hora de Inicio MIV	22:54
Fecha de Inicio MIV	18/09/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 08:54	Fecha de término: 20/09/2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	12	10	2	I
2	9	6	3	II
3	17	12	5	I
4	10	8	2	II
TOTAL	47	35	12	

% MADURACION	76.60
% MADURACIÓN "I"	78.57
% MADURACIÓN "II"	73.68

Observaciones Finales MIV - 05:

- Se presentaron ovocitos completamente desnudados a pesar de no haber colocado de esta clasificación a la MIV.
- Los ovocitos que no presentaron una mayor cantidad de células de cúmulus no se consideraron maduros y por ende no pasaron a FIV.

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: 10:25	Fecha: 20/09/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	6	0	0	0	0	0
2	7	0	2	0	0	0
3	8	0	0	1	0	0
4	6	0	1	0	0	0
Total	27	0	3	1	0	0
Total embriones 9° día		4				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
14.81	3.70	0	0

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. - 06 – 25 /09 /2014

Corrida: N° 6

Fecha: 25 de Septiembre del 2014

Hora Inicio de Colección	10:30
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	13:45
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	19:02

Fuente de recolección: Camal Municipal Nuñoa

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	28
Ovarios con Cuerpo Lúteo	10
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	18
Temperatura de Llegada	37.6 °C

Observaciones:

- Buen manejo de temperatura.
- Buena cantidad de ovarios sin cuerpo lúteo.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.5
Hora Inicio	19:30
Hora Termino	00:50
Metodología	<ul style="list-style-type: none"> - Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Buena cantidad de ovarios sin cuerpo lúteo, en los cuales se priorizó la recuperación.
- Buenas características del ovocito recuperado tanto en categoría A y categoría B.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. - 06 – 25 /09 /2014

Corrida: N° 6

Fecha: 25 de Septiembre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	27
Con Cuerpo Lúteo	10
Sin Cuerpo Lúteo	17
Ovocitos Recuperados Totales	215
Clasificación	
Categoría I	32
Categoría II	24
Categoría III	159
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	7.96
	Ovocitos/Ovario

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. - 06 – 25 /09 /2014

Fecha de Corrida: 25 de septiembre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. – 06 – 25/09/2014
Hora de Inicio MIV	00:50
Fecha de Inicio MIV	25/09/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 10:50	Fecha de término: 27 – 09 – 2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	21	18	3	I
2	8	3	5	I
3	3	3	-	I
5	8	7	1	II
6	16	15	1	II
TOTAL	56	46	10	

% MADURACION	82.14
% MADURACIÓN "I"	75
% MADURACIÓN "II"	91.67

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. - 07 – 09 /10 /2014

Corrida: N° 7

Fecha: 09 de Octubre del 2014

Hora Inicio de Colección	10:30
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	13:00
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	18:50

Fuente de recolección: Camal Municipal Nuñoa

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	20
Ovarios con Cuerpo Lúteo	10
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	10
Temperatura de Llegada	36.1 °C

Observaciones:

- Buen manejo de temperatura.
- Ovarios con abundantes folículos sin desarrollar y hemorrágicos.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.5 °C
Hora Inicio	19:25
Hora Termino	22:47
Metodología	<ul style="list-style-type: none"> - Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Se priorizó el trabajo con los ovarios sin cuerpo lúteo.
- Se descartó ovarios con folículos sin desarrollar y hemorrágicos.
- Se trabajó solamente sobre los folículos superficiales.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. - 07 – 09 /10 /2014

Corrida: N° 7

Fecha: 09 de Octubre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	17
Con Cuerpo Lúteo	9
Sin Cuerpo Lúteo	8
Ovocitos Recuperados Totales	248
Clasificación	
Categoría I	34
Categoría II	23
Categoría III	191
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	14.58
	Ovocitos/Ovario

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. - 07 – 09 /10 /2014

Fecha de Corrida: 09 de Octubre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. – 07 – 09/10/2014
Hora de Inicio MIV	23:14
Fecha de Inicio MIV	09/10/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 23:14	Fecha de término: 11/10/2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	20	20	0	I
2	14	14	0	I
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	12	12	0	II
6	11	9	2	II
TOTAL	57			

% MADURACION	96.49
% MADURACIÓN "I"	100
% MADURACIÓN "II"	91.30

Corrida: N° 7

Fecha: 09 de Octubre del 2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: 10:46	Fecha: 11/10/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	17	1	3	1	0	0
2	5	0	0	0	0	0
3	11	1	0	0	0	0
4	7	0	0	1	0	0
Total	40	2	3	2	0	0
Total embriones 9° día		7				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
17.5	5	0	0

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. - 08 –15 /10 /2014

Corrida: N° 8

Fecha: 15 de Octubre del 2014

Hora Inicio de Colección	14:10
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	15:30
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	16:05

Fuente de recolección: CBF – Sta. Lucía

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	7
Ovarios con Cuerpo Lúteo	1
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	6
Temperatura de Llegada	35.0 +/- 5 °C

Observaciones:

- La recolección de los ovarios se realizó post-beneficio.
- La recolección manejó un tiempo aproximado de 7 horas de retraso en la extracción.
- Los ovarios al momento de su recolección ya se encontraban de 5 a 10 °C aprox.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.5 °C
Hora Inicio	18:45
Hora Termino	20:28
Metodología	<ul style="list-style-type: none"> - Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Gran cantidad de ovocitos en categoría C
- Ovocitos con predisposición a perder las células del cúmulus.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. - 08 –15 /10 /2014

Corrida: N° 8

Fecha: 15 de Octubre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	7
Con Cuerpo Lúteo	1
Sin Cuerpo Lúteo	6
Ovocitos Recuperados Totales	70
Clasificación	
Categoría I	2
Categoría II	6
Categoría III	62
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	10.00
Ovocitos/Ovario	

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. - 08 – 15 /10 /2014

Fecha de Corrida: 15 de octubre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. – 08 – 15/10/2014
Hora de Inicio MIV	20:28
Fecha de Inicio MIV	25/10/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 06:28	Fecha de término: 17 – 10 – 2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	2	2	0	I / II
2	6	4	2	I / II
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
TOTAL	8	6	2	-

% MADURACION	75.00
% MADURACIÓN “I”	100.00
% MADURACIÓN “II”	66.66

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. - 09 – 16 /10 /2014

Corrida: N° 9

Fecha: 16 de Octubre del 2014

Hora Inicio de Colección	10:00 aprox.
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	13:00 aprox.
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	20:10

Fuente de Recolección: Camal Municipal Ayaviri

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	14
Ovarios con Cuerpo Lúteo	3
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	11
Temperatura de Llegada	35.7°C

Observaciones:

- La recolección de los ovarios se realizó post-beneficio.
- El problema en el tiempo de transporte de debió a inconvenientes ajenos en el centro de beneficio.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.5°C
Hora Inicio	21:06
Hora Termino	00:08
Metodología	<ul style="list-style-type: none"> - Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Los ovocitos recuperados de los ovarios con CL siempre tienen la predisposición a perder las células del cúmulus.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. - 09 – 16 /10 /2014

Corrida: N° 9

Fecha: 16 de Octubre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	13
Con Cuerpo Lúteo	3
Sin Cuerpo Lúteo	10
Ovocitos Recuperados Totales	135
Clasificación	
Categoría I	26
Categoría II	17
Categoría III	92
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	10:38
	Ovocitos/Ovario

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. - 09 – 16 /10 /2014

Fecha de Corrida: 16 de Octubre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. - 09 – 16 /10 /2014
Hora de Inicio MIV	00:08
Fecha de Inicio MIV	16/10/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 10:08	Fecha de término: 18/10/2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	23	23	0	I
2	3	3	0	I
5	3	3	0	II
6	14	12	2	II
TOTAL	43	41	2	

% MADURACION	95.35
% MADURACIÓN "I"	100
% MADURACIÓN "II"	88.23

Corrida: N° 9

Fecha: 16 de Octubre del 2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: S.R.	Fecha: 18/10/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	16	0	2	0	1	0
2	1	0	0	0	0	0
5	3	0	0	0	0	0
6	6	0	0	0	0	0
Total	26	0	2	0	1	0
Total embriones 9° día		3				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
11.53	0	3.84	0

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. - 10 – 17 /10 /2014

Corrida: N° 10

Fecha: 17 de octubre del 2014

Hora Inicio de Colección	09:15
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	11:27
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	12:15

Fuente de Recolección: C.B.F. Sta. Lucía

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	14
Ovarios con Cuerpo Lúteo	5
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	9
Temperatura de Llegada	36.1°C

Observaciones:

- Relativa limpieza en el centro de beneficio.
- Almacenamiento en el termo por 5 horas.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.5°C
Hora Inicio	19:00 aprox.
Hora Termino	23:09
Metodología	<ul style="list-style-type: none"> - Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Sin observaciones relevantes.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. - 10 – 17 /10 /2014

Corrida: N° 10

Fecha: 17 de octubre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	12
Con Cuerpo Lúteo	5
Sin Cuerpo Lúteo	7
Ovocitos Recuperados Totales	83
Clasificación	
Categoría I	17
Categoría II	4
Categoría III	62
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	6.91
	Ovocitos/Ovario

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. - 10 – 17 /10 /2014

Fecha de Corrida: 17 de octubre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. - 10 – 17 /10 /2014
Hora de Inicio MIV	23:09
Fecha de Inicio MIV	17/10/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 09:09	Fecha de término: 19/10/2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	9	9	0	I
3	8	7	1	I
5	4	3	1	II
TOTAL	21	19	2	

% MADURACION	90.48
% MADURACIÓN "I"	52.94
% MADURACIÓN "II"	75

Corrida: N° 10

Fecha: 17 de octubre del 2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: S.R.	Fecha: 19/10/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	8	0	0	0	0	0
3	6	0	0	0	0	0
5	2	0	0	0	0	0
Total	16	0	0	0	0	0
Total embriones 9° día		0				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
0	0	0	0

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. -11 – 20 /10 /2014

Corrida: N°: 11

Fecha: 20 de octubre del 2014

Hora Inicio de Colección	09:30
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	13:33
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	14:00

Fuente de Recolección: C.B.F. Sta. Lucía

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	30
Ovarios con Cuerpo Lúteo	11
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	19
Temperatura de Llegada	38°C

Observaciones:

- Temperatura de llegada en el tope recomendada para transporte.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.5°C
Hora Inicio	21:15
Hora Termino	02:10
Metodología	- Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Sin observaciones relevantes.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. -11 – 20 /10 /2014

Corrida: N°: 11

Fecha: 20 de octubre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	24	
Con Cuerpo Lúteo	7	
Sin Cuerpo Lúteo	17	
Ovocitos Recuperados Totales	165	
Clasificación		
Categoría I	26	
Categoría II	22	
Categoría III	117	
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	6.87	Ovocitos/Ovario

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. -11 – 20 /10 /2014

Fecha de Corrida: 20 de octubre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. -11 – 20 /10 /2014
Hora de Inicio MIV	02:10
Fecha de Inicio MIV	21/10/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 12:10	Fecha término: 22/10/2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	16	13	3	I
2	10	9	1	I
4	12	12	0	II
5	10	10	0	II
TOTAL	48	44	4	

% MADURACION	91.67
% MADURACIÓN “I”	84.61
% MADURACIÓN “II”	45.45

Corrida: N°: 11

Fecha: 20 de octubre del 2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: S.R.	Fecha: 22/10/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	8	0	0	0	1	0
2	9	0	0	0	0	0
4	12	0	0	0	0	0
5	10	0	0	0	0	0
Total	39	0	0	0	1	0
Total embriones 9° día		1				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
2.56	0	2.56	0

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. -12 – 23 /10 /2014

Corrida: N°: 12

Fecha: 23 de octubre del 2014

Hora Inicio de Colección	10:30
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	13:00
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	20:00

Fuente de Recolección: Camal Municipal Nuñoa

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	23
Ovarios con Cuerpo Lúteo	S.R.
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	S.R.
Temperatura de Llegada	S.R.

Observaciones:

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.5°C
Hora Inicio	20:45
Hora Termino	00:06
Metodología	- Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Sin observaciones relevantes.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. -12 – 23 /10 /2014

Corrida: N°: 12
Fecha: 23 de octubre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	18
Con Cuerpo Lúteo	S.R.
Sin Cuerpo Lúteo	S.R.
Ovocitos Recuperados Totales	126
Clasificación	
Categoría I	26
Categoría II	21
Categoría III	79
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	7.00
	Ovocitos/Ovario

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. -12 – 23 /10 /2014

Fecha de Corrida: 23 de octubre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. -12 – 23 /10 /2014
Hora de Inicio MIV	00:06
Fecha de Inicio MIV	23/10/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 10:06	Fecha término: 25/10/2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	18	6	12	I
2	8	8	0	I
5	13	12	1	II
6	8	7	1	II
TOTAL	47	33	14	

% MADURACION	70.21
% MADURACIÓN "I"	53.84
% MADURACIÓN "II"	90.48

Corrida: N°: 12

Fecha: 23 de octubre del 2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: S.R.	Fecha: 25/10/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	6	1	1	1	0	0
2	8	0	0	0	0	0
4	12	0	1	0	0	0
5	15	0	0	0	0	0
Total	31	1	2	1		0
Total embriones 9° día		4				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
12.90	3.22	0	0

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. -13 – 24 /10 /2014

Corrida: N°: 13

Fecha: 24 de octubre del 2014

Hora Inicio de Colección	09:15
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	13:45
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	14:15

Fuente de Recolección: C.B.F. Sta. Lucía

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	12
Ovarios con Cuerpo Lúteo	6
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	6
Temperatura de Llegada	37.6°C

Observaciones:

- Sin observación relevante.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.5°C
Hora Inicio	20:00
Hora Termino	23:13
Metodología	<ul style="list-style-type: none"> - Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Sin observaciones relevantes.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. -13 – 24 /10 /2014

Corrida: N° 13

Fecha: 24 de octubre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	12
Con Cuerpo Lúteo	6
Sin Cuerpo Lúteo	6
Ovocitos Recuperados Totales	109
Clasificación	
Categoría I	31
Categoría II	31
Categoría III	47
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	9.08
Ovocitos/Ovario	

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. -13 – 24 /10 /2014

Fecha de Corrida: 24 de octubre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. -13 – 24 /10 /2014
Hora de Inicio MIV	23:13
Fecha de Inicio MIV	24/20/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 09:13	Fecha término: 26/10/2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	7	6	1	I
2	10	9	1	I
3	14	12	2	I
5	16	8	8	II
6	15	15	0	II
TOTAL	62	50	12	

% MADURACION	80.65
% MADURACIÓN "I"	48.38
% MADURACIÓN "II"	74.19

Corrida: N° 13

Fecha: 24 de octubre del 2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: S.R.	Fecha: 26/10/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	11	0	0	1	0	0
2	14	0	0	0	0	0
4	7	0	0	0	0	0
5	12	0	2	2	0	0
Total	44	0	2	3	0	0
Total embriones 9° día		4				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
11.36	6.81	0	0

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. -14 – 30 /10 /2014

Corrida: N° 14

Fecha: 30 de octubre del 2014

Hora Inicio de Colección	10:30
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	13:40
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	19:09

Fuente de Recolección: Camal Municipal Nuñoa

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	28
Ovarios con Cuerpo Lúteo	13
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	15
Temperatura de Llegada	36.6°C

Observaciones:

- Ovarios con folículos hemorrágicos.
- Presencia se ovarios sin cuerpo lúteo pero un escaso número de folículos.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	37.8°C
Hora Inicio	20:25
Hora Termino	23:39
Metodología	<ul style="list-style-type: none"> - Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Sin observaciones relevantes.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. -14 – 30 /10 /2014

Corrida: N° 14

Fecha: 30 de octubre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	22
Con Cuerpo Lúteo	12
Sin Cuerpo Lúteo	10
Ovocitos Recuperados Totales	180
Clasificación	
Categoría I	27
Categoría II	26
Categoría III	127
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	8.18
Ovocitos/Ovario	

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. -14 – 30 /10 /2014

Fecha de Corrida: 30 de octubre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. -14 – 30 /10 /2014
Hora de Inicio MIV	23:39
Fecha de Inicio MIV	30/10/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 09:39	Fecha término: 01/11/2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	20	20	0	I
2	7	7	0	I
5	11	11	0	II
6	15	15	0	II
TOTAL	53	53	0	

% MADURACION	100
% MADURACIÓN "I"	100
% MADURACIÓN "II"	100

Corrida: N° 14

Fecha: 30 de octubre del 2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: S.R.	Fecha: 01/11/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	19	0	0	0	0	0
2	7	0	0	0	0	0
4	11	0	0	0	0	0
5	15	0	1	0	0	0
Total	52	0	1	0	0	0
Total embriones 9° día		1				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
1.92	0	0	0

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. -15 – 31 /10 /2014

Corrida: N°: 15

Fecha: 31 de octubre del 2014

Hora Inicio de Colección	12:15
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	13:00 aprox.
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	14:00 aprox.

Fuente de Recolección: C.B.F. Sta. Lucía

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	6
Ovarios con Cuerpo Lúteo	3
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	3
Temperatura de Llegada	35.0°C

Observaciones:

- Sin observaciones relevantes.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.5°C
Hora Inicio	S.R.
Hora Termino	S.R.
Metodología	<ul style="list-style-type: none"> - Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Sin observaciones relevantes.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. -15 – 31 /10 /2014

Corrida: N°: 15
Fecha: 31 de octubre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	6
Con Cuerpo Lúteo	3
Sin Cuerpo Lúteo	3
Ovocitos Recuperados Totales	26
Clasificación	
Categoría I	12
Categoría II	12
Categoría III	2
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	4.3
Ovocitos/Ovario	

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. -15 – 31 /10 /2014

Fecha de Corrida: 31 de octubre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. -15 – 31 /10 /2014
Hora de Inicio MIV	22:11
Fecha de Inicio MIV	31/10/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 08:11	Fecha término: 02/11/2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	12	4	8	I
4	12	4	8	II
TOTAL	24	8	16	

% MADURACION	33.33
% MADURACIÓN “I”	33.33
% MADURACIÓN “II”	33.33

Corrida: N°: 15

Fecha: 31 de octubre del 2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: S.R.	Fecha: 02/11/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	4	0	1	0	1	0
4	4	0	0	0	0	0
Total	8	0	1	0	1	0
Total embriones 9° día		2				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
25	0	12.5	0

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. -16 – 05 /11 /2014

Corrida: N° 16

Fecha: 05 de noviembre del 2014

Hora Inicio de Colección	08:45
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	10:30
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	11:00

Fuente de Recolección: C.B.F. Sta. Lucía

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	6
Ovarios con Cuerpo Lúteo	2
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	4
Temperatura de Llegada	25.0 °C

Observaciones:

- Procedencia de alpacas madres viejas.
- Dos de ellas con feto en desarrollo preliminar al parto.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	37.2°C
Hora Inicio	19:26
Hora Termino	21:45
Metodología	<ul style="list-style-type: none"> - Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Sin observaciones relevantes.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. -16 – 05 /11 /2014

Corrida: N° 16

Fecha: 05 de noviembre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	6
Con Cuerpo Lúteo	2
Sin Cuerpo Lúteo	4
Ovocitos Recuperados Totales	54
Clasificación	
Categoría I	18
Categoría II	14
Categoría III	22
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	9.0
	Ovocitos/Ovario

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. -16 – 05 /11 /2014

Fecha de Corrida: 05 de noviembre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. -16 – 05 /11 /2014
Hora de Inicio MIV	21:45
Fecha de Inicio MIV	05/11/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 07:45	Fecha término: 07/11/2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	18	18	0	I
4	14	6	8	II
TOTAL	32	24	8	

% MADURACION	75
% MADURACIÓN "I"	100
% MADURACIÓN "II"	42.86

Corrida: N° 16

Fecha: 05 de noviembre del 2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: S.R.	Fecha: 07/11/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	19	5	2	3	0	0
4	5	0	2	0	0	0
Total	24	5	4	3	0	0
Total embriones 9° día		12				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
50	12.5	0	0

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. -17 – 06 /11 /2014

Corrida: N° 17

Fecha: 06 de noviembre del 2014

Hora Inicio de Colección	09:30
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	13:30
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	18:00

Fuente de Recolección: Camal Municipal Nuñoa

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	22
Ovarios con Cuerpo Lúteo	5
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	17
Temperatura de Llegada	37.2°C

Observaciones:

- Ovarios de alpacas gestantes

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.5°C
Hora Inicio	S.R.
Hora Termino	23:29
Metodología	<ul style="list-style-type: none"> - Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Sin observaciones relevantes.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. -17 – 06 /11 /2014

Corrida: N° 17

Fecha: 06 de noviembre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	22
Con Cuerpo Lúteo	5
Sin Cuerpo Lúteo	17
Ovocitos Recuperados Totales	109
Clasificación	
Categoría I	23
Categoría II	24
Categoría III	62
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	4.95
	Ovocitos/Ovario

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. -17 – 06/11 /2014

Fecha de Corrida: 06 de noviembre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. -17 – 06 /11 /2014
Hora de Inicio MIV	23:29
Fecha de Inicio MIV	06/11/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 09:29	Fecha término: 08/11/2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	23	15	8	I
5	14	14	0	II
6	10	10	0	II
TOTAL	47	39	0	

% MADURACION	82.98
% MADURACIÓN "I"	65.21
% MADURACIÓN "II"	100

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. -18 – 07 /11 /2014

Corrida: N° 18

Fecha: 07 de noviembre del 2014

Hora Inicio de Colección	08:50
Hora de Partida Sta. L. – CIP Quimsachata	11:30
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	12:00

Fuente de Recolección: C.B.F. Sta. Lucía

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	18
Ovarios con Cuerpo Lúteo	8
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	10
Temperatura de Llegada	S.R.

Observaciones:

- Sin observaciones relevantes.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.5°C
Hora Inicio	20:38
Hora Termino	00:05
Metodología	<ul style="list-style-type: none"> - Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Sin observaciones relevantes.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. -18 – 07 /11 /2014

Corrida: N° 18

Fecha: 07 de noviembre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	17
Con Cuerpo Lúteo	7
Sin Cuerpo Lúteo	10
Ovocitos Recuperados Totales	104
Clasificación	
Categoría I	17
Categoría II	25
Categoría III	62
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	6.11
	Ovocitos/Ovario

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. -18 – 07 /11 /2014

Fecha de Corrida: 07 de noviembre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. -18 – 07 /11 /2014
Hora de Inicio MIV	00:05
Fecha de Inicio MIV	08/11/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 10:05	Fecha término: 10/11/2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	17	12	5	I
5	7	7	0	II
6	18	15	3	II
TOTAL	42	34	8	

% MADURACION	80.95
% MADURACIÓN "I"	70.58
% MADURACIÓN "II"	88.00

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. -19 – 13 /11 /2014

Corrida: N° 19

Fecha: 13 de noviembre del 2014

Hora Inicio de Colección	10:00
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	13:00
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	19:00

Fuente de Recolección: Camal Municipal Nuñoa

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	26
Ovarios con Cuerpo Lúteo	9
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	17
Temperatura de Llegada	35.3°C

Observaciones:

- Manejo adecuado de la temperatura de transporte.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	38.5°C
Hora Inicio	20:15
Hora Termino	23:45
Metodología	<ul style="list-style-type: none"> - Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Presencia de folículos hemorrágicos y escasos folículos trabajables.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. -19 – 13 /11 /2014

Corrida: N° 19

Fecha: 13 de noviembre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	21
Con Cuerpo Lúteo	8
Sin Cuerpo Lúteo	13
Ovocitos Recuperados Totales	76
Clasificación	
Categoría I	28
Categoría II	12
Categoría III	36
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	3.62
	Ovocitos/Ovario

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. -19 – 13 /11 /2014

Fecha de Corrida: 13 de noviembre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. -19 – 13 /11 /2014
Hora de Inicio MIV	23:45
Fecha de Inicio MIV	13/11/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 09:45	Fecha término: 15/11/2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	20	19	1	I
2	8	7	1	I
6	10	7	3	II
TOTAL	38	33	5	

% MADURACION	86.84
% MADURACIÓN “I”	92.85
% MADURACIÓN “II”	70.00

Corrida: N° 19

Fecha: 13 de noviembre del 2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: S.R.	Fecha: 15/11/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	5	1	0	0	0	0
2	4	0	0	1	0	0
6	10	0	0	2	0	0
Total	19	1	0	3	0	0
Total embriones 9° día		4				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
21.05	15.78	0	0

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. -20 – 14 /11/2014

Corrida: N° 20

Fecha: 14 de noviembre del 2014

Hora Inicio de Colección	08:00
Hora de Partida Nuñoa – CIP Quimsachata	12:30
Hora de Llegada al CIP Quimsachata	13:15

Fuente de Recolección: C.B.F. Sta. Lucía

DATOS DE LA MUESTRA:

Ovarios Totales	16
Ovarios con Cuerpo Lúteo	8
Ovarios sin Cuerpo Lúteo	8
Temperatura de Llegada	35.0°C

Observaciones:

- Sin observaciones relevantes.

DATOS DE LA RECUPERACION:

Temperatura Conservación	37 – 38.0 °C
Hora Inicio	20:39
Hora Termino	23:45
Metodología	<ul style="list-style-type: none"> - Slicing - Lavados con M. Lavado (3) - Lavados con M. Maduración (1)

Observaciones:

- Sin observaciones relevantes.

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE RESULTADOS

COD: R.O. -20 – 14 /11/2014

Corrida: N° 20

Fecha: 14 de noviembre del 2014

RESULTADOS RECUPERACIÓN

Ovarios Trabajados	15
Con Cuerpo Lúteo	7
Sin Cuerpo Lúteo	8
Ovocitos Recuperados Totales	76
Clasificación	
Categoría I	29
Categoría II	5
Categoría III	42
PROMEDIO DE RECUPERACIÓN	5.06
	Ovocitos/Ovario

MADURACIÓN IN VITRO

COD: M.I.V. -20 – 14 /11 /2014

Fecha de Corrida: 14 de noviembre del 2014

Código de Recuperación Ovocitos	R.O. -20 – 14 /11/2014
Hora de Inicio MIV	23:45
Fecha de Inicio MIV	14/11/2014

RESULTADOS

Tiempo de Maduración	34 horas
----------------------	----------

PLACA I	
Hora: 09:45	Fecha término: 16/11/2014

N° Pocillos	N° Ovocitos	Madurados	Sin Madurar	Clasificación
1	20	16	4	I
2	9	7	2	I
6	5	5	0	II
TOTAL	34	28	6	

% MADURACION	82.35
% MADURACIÓN "I"	79.31
% MADURACIÓN "II"	100

Corrida: N° 20

Fecha: 14 de noviembre del 2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: S.R.	Fecha: 16/11/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	14	1	0	1	1	0
6	4	0	0	0	0	0
Total	18	1	0	1	1	0
Total embriones 9° día		3				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
16.67	5.56	5.56	-

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. -21 – 19 /11/2014

Corrida: N° 21

Fecha: 19 de noviembre del 2014 – 29 de noviembre del 2014

Fuente de Recolección:

- C.B.F. Sta. Lucía

COD: R.O. -21 – 22 /11/2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: S.R.	Fecha: 22/11/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	10	2	0	1	1	0
2	20	2	0	3	0	0
4	17	1	0	0	0	0
6	9	2	0	1	0	0
Total	56	7	0	5	1	0
Total embriones 9° día		11				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
23.21	8.92	1.78	-

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. -22 – 20 /11/2014

Corrida: N° 22

Fecha: 19 de noviembre del 2014 – 29 de noviembre del 2014

Fuente de Recolección:

- Camal Municipal Nuñoa

COD: R.O. -22 – 20 /11/2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: S.R.	Fecha: 20/11/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	5	0	0	0	0	0
6	5	0	1	0	0	0
Total	10	0	1	0	0	0
Total embriones 9° día		1				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
10	10	-	-

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. -23 – 21 /11/2014

Corrida: N° 23

Fecha: 19 de noviembre del 2014 – 29 de noviembre del 2014

Fuente de Recolección:

- C.B.F. Sta. Lucía

COD: R.O. -23 – 21 /11/2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: S.R.	Fecha: 21/11/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	12	0	0	0	0	0
6	5	1	1	0	0	0
Total	17	1	1	0	0	0
Total embriones 9° día		2				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
11.76	-	-	-

RECUPERACION DE OVOCITOS
HOJA DE DATOS

COD: R.O. -24 – 21 /11/2014

Corrida: N° 21-22-23-24

Fecha: 19 de noviembre del 2014 – 29 de noviembre del 2014

Fuente de Recolección:

- C.B.F. Sta. Lucía

COD: R.O. -24 – 21 /11/2014

FERTILIZACION Y CULTIVO IN VITRO

PLACA I	
Hora: S.R.	Fecha: 21/11/2014

N° Pocillos	Cigotos Cultivados	Desarrollo Embrionario				
		2 Blastómeros	4 Blastómeros	Mórula	Blastocisto	B. Eclosionado
1	12	0	4	1	0	0
5	6	0	0	0	0	0
Total	18	0	4	1	0	0
Total embriones 9° día		5				

% División Embrionaria	% Móculas	% Blastocistos	% Blastocisto Eclosionado
22.22	5.55	-	-

ANEXO 10. PROTOCOLO DE FERTILIZACIÓN IN VITRO EN ALPACAS

PROTOCOLO PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *in vitro* DE ALPACA (*Vicugna pacos*)

CONSIDERACIONES PREVIAS E INTRODUCCIÓN AL PROTOCOLO

El presente Protocolo de Fertilización *in vitro* en Alpacas es consecuencia del trabajo de tesis intitulado: “Evaluación de la *Fertilización in vitro* de ovocitos de Alpaca (*Vicugna pacos*) recuperados de ovarios del matadero de Nuñoa – Puno 2014” realizado en su totalidad a 4200 msnm, en el Centro de Innovación y Producción de Quimsachata de la E.E.A. Illpa – INIA Puno, en el periodo Agosto – Noviembre considerado como época de baja eficiencia reproductiva en camélidos sudamericanos.

Este protocolo tomó como referencia base el Protocolo para la Producción de Embriones *in vitro* en Bovinos del Dr. Pedro García Herradón de la Universidad de Santiago de Compostela – España, así como diversas consideraciones y modificaciones tomadas en cuenta de otras investigaciones realizadas en camélidos.

Cabe resaltar el trabajo conjunto y coordinado de los doctores del Programa Nacional de Investigación en Camélidos del INIA, así como profesionales en esta área que permitieron llevar a cabo la adaptación de este protocolo para profundizar y ampliar la gama de tecnologías aplicables en pro del mejoramiento del ganado alpaquero en el Perú.

Rajiv E. Málaga Chuquitaype
Bach. Ingeniería Biotecnológica -UCSM

PREPARACIÓN DEL MEDIO PARA EL TRANSPORTE DE LOS OVARIOS

- Preparar la Solución Salina 0.9% mezclando 9 gr de NaCl y 1000 ml de agua ultra pura mili-Q.
- Calentar la solución hasta que rompa el hervor.
- Añadir 10 ml de Antibiótico antimicótico cuando la temperatura de la solución haya descendido hasta 37 °C. No añadirla a altas temperaturas debido a que pierde funcionalidad el antibiótico.

RECOGO Y TRANSPORTE DE OVARIOS

- Realizar la extracción de los ovarios después del beneficio del animal, justo al momento que sus órganos internos se vean expuestos. Evitar que los ovarios entren en contacto con el piso o tengan exposición prolongada de los ovarios al medio ambiente.

- Introducirlos inmediatamente en el termo con medio de transporte y mantener la temperatura en un rango de 35.5 hasta 37.5°C máximo. Idealmente mantener los ovarios a 37°C hasta el momento en que se inicie su manipulación.

RECUPERACIÓN DE LOS OVOCITOS

- Realizar la recuperación del Complejo Ovocito Cúmulus (COC) bajo visualización en estereoscopio, empleando pinzas y bisturí.
- Colocar el ovario en una placa Petri con 20 ml de medio de Lavado previamente preparado y temperado en el baño termostático a 37°C.
- Visualizar el folículo del cual se realizará la extracción y sujetando firmemente el ovario con la pinza, realizar un corte longitudinal en la superficie del folículo suavemente para permitir la salida de todo el COCs.
- Aspirar el COCs empleando una micropipeta (10 μ l o 20-200 μ l) al momento de su visualización y colocarlo en una placa Petri pequeña con 5 ml de medio de Lavado para su mantenimiento y posterior selección.

OBSERVACIÓN:

La aspiración del COCs se puede realizar justo al momento de su liberación por el corte folicular o al finalizar el corte de todos los folículos de trabajo.

a) Clasificación y Selección del COCs:

- Seleccionar para el trabajo solamente los ovocitos que presenten un citoplasma pignótica como morfológicamente homogéneo.
- La clasificación de ovocitos para el trabajo puede ser dada por el investigador basándose en los diferentes parámetros mencionados en la literatura.
- Lavar los ovocitos seleccionados tres (3) veces en gotas de 50 μ l con medio de Lavado anteriormente preparado y temperado.
- Realizar un (1) lavado en 50 μ l de medio de maduración al cual se depositaran. Realizarlo cuidadosamente para evitar el desnudamiento de los ovocitos.

MADURACIÓN *in vitro*

a) Preparación de Placas para MIV:

- En la placa de 6 pocillos, dispensar en cada pocillo 500 μ l de medio de Maduración previamente preparado.
- Tapar la placa y rotularla con el número de la corrida y la fecha de trabajo.
- Colocar la placa en la cámara de CO₂ para su estabilización, 2 horas antes de colocar los ovocitos.

b) Disposición de los ovocitos para su MIV:

- Colocar en un número no mayor de 25 ovocitos por pocillo empleando una micropipeta.
- Evitar que un número menor a 5 ovocitos se encuentre en cada pocillo de ser posible.
- Registrar el número de ovocitos colocados en cada pocillo numerado y la categoría de estos para llevar un registro en cuanto al progreso de su maduración
- Colocar la placa con los ovocitos en la incubadora a 38.5°C, 5% de CO₂ y 100 % de humedad por un tiempo de maduración de 34 horas.

FERTILIZACIÓN *in vitro*

a) Tratamiento del Semen post-colección:

- Colocar el semen colectado en baño termostático a 37.0 °C y añadir en la proporción 1:1 el Dilutor Tris- Yema de Huevo.
- Pipetear hasta que se mezcle completamente el dilutor y el semen colectado.

b) Selección Espermática:

- Preparar la gradiente de Percoll en la densidad requerida. Se recomienda trabajar con la densidad 45 %/22.5 %
- Inclinar 45° el tubo con la gradiente y colocar suavemente por las paredes 500 µl de la muestra de semen con Dilutor. El semen se colocará en la parte superficial del tubo sobre la gradiente.
- Centrifugar por 10 minutos a 3500 RPM (las revoluciones y el tiempo de centrifugación dependerá de la cantidad, filancia y contaminación del semen)

c) Lavado Espermático:

- Terminada la centrifugación, eliminar por decantación o empleando una micropipeta toda la gradiente y restos de plasma seminal del tubo.
- Lavar las paredes y resuspender el pellet formado con 100 µl de medio SPERM-TALP.
- Concentrar todos los volúmenes de resuspensión de todas las gradientes realizadas en tubos Eppendorf, y centrifugar por 5 minutos a 650 RPM.

IMPORTANTE: Evitar la resuspensión o eliminación del pellet formado que contiene los espermatozoides.

d) Capacitación Espermática:

- Resuspender el pellet de espermatozoides formado con 230 µl de FERTIL-TALP.

- Colocar en un tubo Eppendorf, 220 μ l de la Solución Espermática resuspendida, 30 μ l de solución de Heparina y 30 μ l de solución PHE (Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina)
- Evaluar el progreso y la eficiencia en el aumento de la motilidad en microscopio antes de realizar la fertilización.

e) Preparación de las placas para FIV:

- Colocar 250 μ l de medio FERTIL-TALP en cada pocillo.
- Rotular con el número de corrida y la fecha de trabajo.
- Colocar la placa con el medio en la Incubadora o Cámara de CO₂, mínimo una hora de antes a colocar los ovocitos.

f) Tratamiento de los Ovocitos Maduros:

- Terminado el tiempo de maduración, recuperar empleando micropipeta todos los ovocitos que se encuentren homogéneos pignótica y morfológicamente. Además de presentar las características morfológicas que indiquen su maduración.
- Realizar tres (3) lavados en gotas de 50 μ l de medio SPERM-TALP y un (1) lavado final en una gota de 50 μ l de FERTIL-TALP antes de colocarlo en la placa de Fertilización.
- Colocar los ovocitos maduros, con la mayor cantidad de células del cúmulus rodeándolos en cada pocillo.
- Colocar la placa de FIV con los ovocitos en la incubadora o cámara de CO₂ por una hora antes de realizar la fertilización.

g) Fertilización *in vitro*:

- Colocar 250 μ l de la Solución Fertilizante preparada (30 μ l Sol. Heparina, 30 μ l Sol. PHE, 220 μ l Sol. Espermática) en cada pocillo con los ovocitos maduros.
- Se alcanzará un volumen final de 500 μ l en cada pocillo de la placa de FIV.
- Dejar en co-cultivo los ovocitos maduros y los espermatozoides capacitados por 18 a 20 horas en la incubadora con un atmósfera de 5% de CO₂, 38.5 °C y 100% de humedad.

IMPORTANTE: El tiempo de co-cultivo dependerá de la motilidad y la concentración de espermatozoides, así como del número de ovocitos a fertilizar. Se recomienda trabajar a 18 horas sin exceder en ningún caso las 20 horas.

CULTIVO *in vitro* DE EMBRIONES

Primera Etapa de Cultivo Embrionario (48 horas):

a) **Preparación de Placas para 1° Medio de Cultivo (KSOMaa):**

- En la placa de 6 pocillos, dispensar en cada pocillo 400 µl de medio KSOMaa previamente preparado.
- Tapar la placa y rotularla con el número de la corrida y la fecha de trabajo.
- Colocar la placa en la incubadora con 5% CO₂, 100% de humedad, y a 38.5°C.

IMPORTANTE: El medio KSOMaa requiere estar preparado con anterioridad y colocarse en la incubadora para su estabilización 12 horas antes de colocar los presuntos cigotos.

b) **Tratamiento de Ovocitos post-Fertilización:**

- Terminado el periodo de co-cultivo, aspirar los ovocitos de la placa de FIV y colocarlos en gotas de 50 µl de medio de cultivo KSOMaa.
- Desprender las células del cúmulus de los presuntos cigotos mediante pipeteo, empleando una micropipeta de 20-200ul. El pipeteo debe ser constante hasta visualizar los ovocitos completamente libres de Células del Cúmulus (CC).
- Realizar tres (3) lavados en gotas de 50 µl de medio KSOMaa antes de pasarlos definitivamente a los pocillos preparados.

c) **1° Cultivo Embrionario en M. KSOMaa:**

- Colocar los presuntos cigotos en los pocillos de la placa de Cultivo Embrionario en una cantidad no mayor a 25 ovocitos por pocillo.
- Rotular la placa con el número de corrida y la fecha de inicio del cultivo.
- Colocarlos en la incubadora a 38.5°C, 5% de CO₂ y 100% humedad.
- Dejar la placa en cultivo por 48 horas, registrando la hora de inicio y la hora a la cual terminará su desarrollo.

Segunda Etapa de Cultivo Embrionario (7 días):

a) **Preparación de Placas para 2° Medio de Cultivo (SOFaa):**

- En la placa de 6 pocillos, dispensar en cada pocillo 500 µl de medio SOFaa previamente preparado.
- Tapar la placa y rotularla con el número de la corrida y la fecha de trabajo.
- Colocar la placa en la incubadora con 5% CO₂, 100% de humedad, y a 38.5°C.

IMPORTANTE: El medio KSOMaa requiere estar preparado con anterioridad y colocarse en la incubadora para su estabilización 2 horas antes de colocar los embriones.

b) 2° Cultivo Embrionario en M. KSOMaa:

- Colocar los embriones en los pocillos de la placa de Cultivo Embrionario en una cantidad no mayor a 25 ovocitos por pocillo.
- Rotular la placa con el número de corrida y la fecha de inicio del cultivo.
- Colocarlos en la incubadora a 38.5°C, 5% de CO₂ y 100% humedad.
- Dejar la placa en cultivo hasta el 6 o 7 día, registrando la fecha de inicio del segundo cultivo.
- Evaluar al 6 día el progreso de los embriones, al cual deben presentarse en etapa de blastocisto eclosionado.

